

Paratuberculosis: estudio de las proteínas de la leche bovina y su impacto
en los parámetros de producción lechera

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Animal*

Sonia Andrea Villamar Manrique

Médico Veterinario y Zootecnista, Universidad Católica de Santa María. 2012



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Silvia Leonor Mundo

Médica Veterinaria Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires

Doctora de la Universidad de Buenos Aires, Área Inmunología Facultad de
Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires

Co-Director de tesis

Gustavo Jaurena

Ingeniero Agrónomo especializado en Zootecnia, Facultad de Agronomía -
Universidad de Buenos Aires

Magíster Scientae en Producción Animal. Pontificia Univ. Católica de Chile.

Doctor of Philosophy” Univ. of Wales, Aberystwyth/IGER

Consejero de Estudios

Liliana Rosa Gilardoni

Médica Veterinaria Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Buenos Aires

Doctora de la Universidad de Buenos Aires

JURADO DE TESIS

JURADO

María Alejandra Herrero

Ingeniera Agrónoma, Especialista en Docencia Universitaria (FCV-UBA)

Magister en Política y Gestión de C y T, (CEA-UBA)

JURADO

Lidia Gogorza

Médica Veterinaria, Especialista en Docencia Universitaria (UNICEN)

Doctora en ciencia animal (Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires)

JURADO

Fernando Paolicchi

Médico Veterinario (Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires)

Magister en Ciencias Biologicas (Universidad de Chile)

Fecha de defensa de la tesis: 05 de Agosto de 2016

A Dios que acompaño
cada paso.

A mi madre Sonía, mi
ángel en el cielo.

A mi padre José, porque
me enseñó la constancia y
fuerza de voluntad.

A Verónica, Nelly, Erika,
Silvia, Lizbeth, Patricia y
Joseph, los pilares de mi
vida.

A Luis, José, Sara,
Aurora, Jesús, Jimena,
Eduardo, Valentina y
Alejandro.

A Paul, el motor, impulso
y apoyo de nuestros
proyectos.

AGRADECIMIENTOS:

Al Estado Peruano, que pudo hacer posible este tan preciado sueño.

A la Facultad de Agronomía y de Ciencias Veterinarias de la UBA, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

A la Dra. Silvia L. Mundo, por integrarme a su equipo de trabajo, por su amistad, dedicación y apoyo incondicional como directora de esta tesis.

Al Ing. Agrónomo Gustavo Jaurena, por su amistad, colaboración y paciencia en todo el trayecto de este trabajo.

A mis amigas de la cátedra de Inmunología, Ana Jolly, Ana Stempler, Bárbara Fernández, María Laura Fortuny, Silvia Colavechia y Guisselle Ingrata, por todos sus consejos, compañía y apoyo moral estos dos años.

Al Dr. Marcos Bontá, a la Dra. Liliana Gilardoni, al Dr. Jorge de la Orden, al Dr. Lucas Goldman, por sus aportes técnicos y su valiosa ayuda en la realización del trabajo de campo y de laboratorio.

A mis compañeros Franco León y Christiaan Ruiz por su amistad y apoyo.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Sonia Andrea Villamar Manrique.

ÍNDICE GENERAL

COMITÉ CONSEJERO.....	iv
Fecha de defensa de la tesis: 05 de Agosto de 2016	v
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL, MARCO TEÓRICO, OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	iv
1.1 Introducción General	2
1.2. Marco Conceptual, Objetivos e Hipótesis	3
1.2.1.- Enfermedad de Johne o paratuberculosis	3
1.2.1.1.- Etiología	3
1.2.1.3- Epidemiología	3
1.2.1.4.- Factores de susceptibilidad	4
o Edad:	4
o Número y momento de lactación:.....	4
o Estrés:	4
1.2.1.5.- Transmisión:.....	4
1.2.1.6.- Resistencia y persistencia:	5
1.2.1.7.- Patogenia:	5
1.2.1.8.- Manifestaciones Clínicas:	6
o Infección latente:	7
o Enfermedad subclínica:	7
o Enfermedad clínica:	7
o Enfermedad clínica avanzada:	7
1.2.1.9.- Lesiones a la necropsia	7
1.2.1.10.- Diagnóstico	8
1.2.2.- Importancia productiva y económica	9
1.2.2.1.- Consecuencias económicas de la PTB:	10
o Disminución de la producción láctea:	10
o Muerte de animales.....	11
o Desechos prematuros.....	11
o Fallas reproductivas.....	11
o Costos médicos:	11
o Costos por el diagnóstico.....	11
1.2.3.- Composición de la leche	11
1.2.3.1.- Síntesis de proteína.	12
o Beta-Lactoglobulina (β -LG)	13
o Alfa-Lactoalbúmina (α -LA)	13

o	Inmunoglobulinas	13
o	Seroalbúmina	13
1.2.3.2.-	Síntesis de grasa.	13
1.3.-	Objetivo General:	15
1.3.1.-	Objetivos particulares	15
1.4.-	Hipótesis General	16
CAPÍTULO 2 ALTERACIONES DEL PERFIL PROTEICO DE LA LECHE POR LA PRESENCIA DE MAP		25
2.1.-	Introducción	18
2.2.-	Materiales y Métodos:	19
2.2.1.-	Origen de las muestras:	19
2.2.2.-	Acondicionamiento y preparación de las muestras de leche.....	19
2.2.3.-	Descripción de las técnicas usadas.....	19
a)	Evaluación de proteínas totales	19
b)	Electroforesis:	19
2.2.4.-	Análisis Estadístico:	20
2.3.-	Resultados	21
2.4.-	Discusión.....	22
2.5.-	Conclusiones Parciales.....	24
CAPÍTULO 3: ALTERACIONES DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE LA PRODUCCIÓN DE LECHE EN PRESENCIA DE MAP IDENTIFICADA A TRAVÉS DE ELISA PPA.....		36
3.1.-	Introducción	26
3.2.-	Materiales y métodos	27
3.2.1.-	Origen de las muestras	27
3.2.2.-	Toma de muestras	27
3.2.3.-	Obtención del suero de leche	27
3.2.4.-	ELISA PPA en suero de leche	28
3.2.5.-	Análisis de las muestras de leche por sólidos totales, grasa, proteína, lactosa y conteo de células somáticas.....	28
3.2.6.-	Análisis estadístico:.....	28
3.3.-	Resultados	30
3.4.-	Discusión.....	33
3.5.-	Conclusiones Parciales.....	35
CAPÍTULO 4 ALTERACIONES DEL PERFIL PROTEICO DE LA LECHE Y SU RELACIÓN CON PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN FUNCIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE MAP		36
4.1.-	Introducción	37
4.2.-	Materiales y Métodos.....	37

4.2.1.- Origen de las muestras	37
4.2.2.- Acondicionamiento de las muestras.....	37
4.2.3.- Descripción de las técnicas usadas.....	37
4.2.4.- Análisis estadístico:.....	38
4.5.- Conclusiones Parciales.....	40
CAPÍTULO 5 IMPACTO ECONÓMICO DE LA PARATUBERCULOSIS BOVINA	41
5.1.- Introducción:	42
5.2.- Materiales y Métodos:.....	42
5.3.- Resultados:	43
5.4.- Discusión.....	43
5.5.- Conclusiones Parciales:.....	43
CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES FINALES	45
CAPÍTULO 7 LISTA BIBLIOGRÁFICA.....	48
CAPÍTULO 8 APÉNDICES	62
8.1. - Anexo I.....	63
8.2.- <i>Anexo II</i>	70
8.3.- <i>Anexo III</i>	86
8.4.- <i>Anexo IV</i>	94

ÍNDICE DE CUADROS:

Cuadro 3.1. Rendimiento promedio lácteo diario y concentración g/dl ⁻¹ (litros, grasa, proteína, lactosa, sólidos totales) y recuento de células somáticas según estado de MAP, tercio de lactación y número de lactancia.....	32
Cuadro 8.1.1. Medición de la Proteína sérica total en el suero de leche expresados en gramo por litro (g l ⁻¹) de los animales escogidos de establecimientos libres e infectados de MAP, diagnosticados a través de la prueba de ELISA, Cultivo fecal y PCR	63
Cuadro 8.1.2. Medición individual de Inmunoglobulinas, α -Lactoalbúmina, β -Lactoglobulina y Seroalbúmina en el suero de leche, expresados en gramo por litro (g l ⁻¹) de los animales escogidos de establecimientos libres e infectados de MAP.....	64
Cuadro 8.1.3. Histogramas para la frecuencia relativa de las clases de las proteínas séricas lácteas, Inmunoglobulinas, α -Lactoalbúmina, β -Lactoglobulina y Seroalbúmina expresadas en gramos por litro (g l ⁻¹) comparadas por la presencia de anticuerpos MAP.....	65
Cuadro 8.1.4. Estadística descriptiva considerando la media, desviación estándar, coeficiente de variación, cuantil 1 y 3 de la proteína sérica, Inmunoglobulinas, α -Lactoalbúmina, β -Lactoglobulina y Seroalbúmina expresados en gramo por litro (g l ⁻¹) comparadas por la presencia o ausencia de anticuerpos MAP	67
Cuadro 8.2.1. Resultados de las mediciones de la producción de litros de leche del día de la toma de muestras, expresados en litros (L), rendimiento de la grasa total (GT), Proteína total (PT), Lactosa total (LcT), Sólidos totales (ST); expresados en gramos totales. Concentración de grasa (G%), Proteína (P%), Lactosa (Lc%), Sólidos (S%), expresados en gramos por decilitro g dl ⁻¹ y recuento de células somáticas RCS expresadas en mil. Cel. /ml. en bovinos libres o no de MAP por la prueba ELISA-PPA (Positivos, Negativos) en suero de leche. Ubicación de estos animales en los grupos formados para número de Lactación (G1=1 lactancia, G2=2 lactancias, G3=3 lactancias a más) y por el tercio de lactación (T=1=1 tercio, T=2=2 tercio, T=3=3 tercio).....	70
Cuadro 8.2.2. Estadística descriptiva (media, desviación estándar, coeficiente de variación, cuantil 1 y 3) de la producción de litros de leche del día de la toma de muestras expresados en litros (L), rendimiento de la grasa total (GT), Proteína total (PT), Lactosa total (LcT), Sólidos totales (ST); expresados en gramos totales. Concentración de grasa (G%), Proteína (P%), Lactosa (Lc%), Sólidos (S%), expresados en gramos por decilitro g dl ⁻¹ y recuento de células somáticas RCS expresadas en mil. Cel. /ml. en animales libres o no de MAP por la prueba ELISA-PPA (Positivos +, Negativos -) en suero de leche	78
Cuadro 8.3.1. Medición individual de Proteína sérica (PS), Inmunoglobulinas (Igs), α -Lactoalbúmina (α -LA), β -Lactoglobulina (β -LG) y Seroalbúmina (SA) en el suero de leche expresados en gramo por litro (g l ⁻¹) de los animales escogidos de establecimientos libres e infectados de MAP por la prueba ELISA-PPA (Positivos, Negativos) en suero de leche. Ubicación de estos animales en los grupos formados para número de Lactación (G1=1 lactancia, G2=2 lactancias, G3=3 lactancias a más) y por el tercio de lactación (T=1=1 tercio, T=2=2 tercio, T=3=3 tercio).....	86
Cuadro 8.3.2. Histogramas para la frecuencia relativa de las clases de las proteínas séricas lácteas, Inmunoglobulinas, α -Lactoalbúmina, β -Lactoglobulina y Seroalbúmina expresadas en gramos por litro (g l ⁻¹) comparadas por la presencia de anticuerpos MAP por la prueba ELISA-PPA (Positivos, Negativos) en suero de leche.	88
Cuadro 8.3.3. Estadística descriptiva considerando la media, desviación estándar, coeficiente de variación (%), cuantil 1 y 3 de la proteína sérica, Inmunoglobulinas, α -Lactoalbúmina, β -Lactoglobulina y Seroalbúmina expresados en	

gramo por litro (g l^{-1}) comparadas por la presencia o ausencia de anticuerpos MAP por la prueba ELISA-PPA (Positivos, Negativos) en suero de leche 90

Cuadro 8.3.4.- Comparación entre las concentraciones de las proteínas séricas presentes en la leche (g l^{-1}) de bovinos respecto a: estado de MAP analizado por la prueba ELISA-PPA (Positivos, Negativos) en suero de leche; tercio de lactación (T1=1 tercio, T2=2 tercio, T3=3 tercio) y al número de Lactación (G1 = 1 lactancia, G2=2 lactancias, G3=3 lactancias a más) 91

Cuadro 8.4.1. Datos económicos de los rodeos en estudio 94

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 2.1. Representación gráfica de la densitometría láctea.....	30
Figura 2.2. Resultados representativos de la electroforesis y lectura en muestras positivas	32
Figura 2.3. Resultados representativos de la electroforesis y lectura en las muestras negativas.....	32
Figura 3.1. Placa representativa del análisis de ELISA-PPA en suero de leche y lectura parcial por espectrofotometría.	46

ABREVIATURAS

MAP	<i>Mycobacterium avium</i> spp. <i>paratuberculosis</i>
PTB	Paratuberculosis
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
MF	Materia fecal
α -LA	Alfa Lactoalbúmina
β - LG	Beta Lactoglobulina
PPA	Antígeno Protoplasmático de MAP
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANVA	Análisis de varianza
IGS	Inmunoglobulinas
SA	Seroalbúmina
PBS	Buffer fosfato alcalino
OPD	Ortophenil endiamina
VC	Valor de corte
DO	Densidad óptica
g.	Gramos
l.	Litros
dl.	Decilitros
DE	Desvío estándar
DES	Diferencia estadística significativa
G	Grasa
P	Proteína
LC	Lactosa
ST	Sólidos totales
CS	Células somáticas
MO	Microorganismo

RESUMEN

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad infecciosa de rumiantes causada por *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP). En los rodeos lecheros afectados la infección por MAP impacta directa o indirectamente en la productividad debido a la reducción de la cantidad de leche producida y la alteración en la composición láctea.

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar las posibles alteraciones en las proteínas del suero de leche de muestras de bovinos infectados con MAP. Se estudió la relación entre las fracciones de proteína sérica y la presencia de anticuerpos específicos anti MAP en suero de leche bovina pertenecientes al banco de muestras de la Cátedra de Inmunología de la FCV-UBA identificadas como positivas o negativas a ADN de MAP a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La composición de la proteína sérica se estudió o evaluó mediante la técnica de electroforesis. Los resultados de los valores de la proteína sérica en presencia de anticuerpos específicos anti MAP disminuyeron en 29% y las fracciones de α -LA y β -LG, disminuyeron en 37, 52 % respectivamente,

Posteriormente se evaluaron 182 hembras bovinas lecheras de raza Holando Argentino en producción, procedentes de tres establecimientos en la provincia de Buenos Aires, las que fueron agrupados según el número y momento de lactancia.

En las muestras de leche se determinó los litros producidos, grasa, proteína, lactosa, sólidos, recuento de células somáticas analizando asociaciones de estas variables y a la presencia de anticuerpos específicos anti MAP mediante la prueba inmunoabsorbente ligado a enzimas utilizando antígeno protoplasmático de PTB (ELISA-PPA), el número y tercio de lactancia. No se hallaron interacciones entre el estado de MAP, el número de parto y el tercio de lactación, por lo que se realizaron los análisis para factores separados.

La prevalencia del muestreo realizado fue del 9%, la cantidad de producción láctea disminuyó en 19%, el rendimiento de la grasa, proteína, sólidos totales y lactosa disminuyeron en un 10%, 18%, 18%, 17% respectivamente, mientras que el número total de células somáticas aumentó en un 27%, la concentración de proteína y lactosa, no se vio modificada y la concentración de grasa y sólidos totales aumentaron (10%, 4% respectivamente); en comparación con los animales negativos.

Por lo tanto, podemos afirmar que en este trabajo la presencia de anticuerpos anti MAP, tuvo un impacto negativo en la cantidad de proteínas del suero lácteo; disminuyendo la calidad de la leche y la cantidad de litros producidos originando una pérdida económica.

Palabras clave: Paratuberculosis, Calidad láctea, Producción de leche, Proteínas del suero de leche.

ABSTRACT

Paratuberculosis (PTB) is an infectious disease of ruminants caused by *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP). In dairy cattle affected with MAP infection has a directly or indirectly impact on productivity due to the reduction of the quantity of milk produced and the change in the milk composition.

This study aimed to identify possible alterations in serum proteins of milk samples from infected cattle with MAP. The relationship between serum protein fractions and the presence of specific antibodies in serum MAP bovine milk samples belonging to the bank of the Department of Immunology at the FCV-UBA identified as positive or negative for MAP DNA was studied through the polymerase chain reaction (PCR). The protein composition of the serum was measured by the technique of electrophoresis and were rated positive or negative. The results of the values of serum protein in the presence of specific anti MAP decreased by 29% and fractions of α -LA and β -LG, decreased by 37 and 52% respectively.

Subsequently 182 dairy female cattle Holando Argentine, were evaluated from three establishments in the city of Buenos Aires, which will be grouped according to the number and timing of lactation.

In milk samples, the liters produced, fat, protein, lactose, solids, somatic cell count were determined by analyzing associations of these variables and the presence of specific anti MAP by enzyme-linked immunosorbent assay using a protoplasmic antigen (ELISA-PPA), number and timing of lactation. No interactions between the state of MAP, the parity and the timing of lactation were found, so analyzes were performed to separate factors.

The prevalence of sampling conducted was 9%, the amount of milk production decreased by 19%, the yield of fat, protein, lactose and total solids decreases by 10%, 18%, 18%, 17% respectively, the total number somatic cells increased by 27%, the concentration of protein and lactose was not altered and the concentration of fat and total solids increase (10%, 4% respectively); compared to negative cattle.

Therefore we can say that in this work the presence of antibodies anti MAP, had a negative impact on the amount of whey proteins; decrease the quality and quantity of milk produced liters causing economic loss.

Keywords: Paratuberculosis, Milk quality, Milk production, Milk whey proteins.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL, MARCO TEÓRICO, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

1.1 Introducción General

La paratuberculosis (PTB) o enfermedad de Johne es una enteritis granulomatosa infecto - contagiosa de curso crónico e incurable que afecta a los rumiantes, causada por *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) (Thorel y cols., 1990). Fue descrita por primera vez por Johne y Frothingham en 1895. (Salgado y cols., 2007). La vía oro-fecal es la principal forma de transmisión, a través de material contaminado por materia fecal, como también de calostro y leche provenientes de bovinos infectados (Sweeney y cols., 1992; Whitlock y Buergelt, 1996; Khare y cols., 2004; Holzmann y cols., 2004; OIE, 2013). También se ha citado la transmisión vía intrauterina y seminal (Sweeney, 1996).

La PTB es una enfermedad de distribución mundial. En la República Argentina los datos existentes de prevalencia estimada en rodeos de cría de la Cuenca del Salado (provincia de Bs. As.) se encuentran entre el 7% y 20% según Paolicchi y Romano (2007) o entre el 25% y 51% para Moreira y cols. (1994). En Sampacho (suroeste de la provincia de Córdoba) es de 5,3% y la prevalencia individual de animales afectados es de 0,3% en establecimientos de cría y mixtos-ciclo completo (Magnano y cols., 2002). La prevalencia estimada en rodeos lecheros en los Estados Unidos de América fue de 40% en el año 2007 (Lombard y cols., 2013) y mayor al 50% en Europa (Nielsen y Toft, 2009).

Debido al aislamiento de MAP en biopsias intestinales de pacientes con la enfermedad de Crohn, se discute la posible vinculación e impacto en la salud humana (Dalziel, 1932; Crohn y cols., 1932; Bihrmann y cols., 2011). El consumo de leche y sus derivados aún pasteurizados es considerado una probable fuente de infección humana (Grant y cols., 2002, Paolicchi y cols., 2007, Cirone y cols., 2007, Shankar y cols., 2009). Según la severidad de los signos clínicos, la excreción de MAP y la probabilidad de detección de la enfermedad, se establecen cuatro estadios de la enfermedad: silencioso, subclínico, clínico y avanzado, (Whitlock y Buergelt, 1996; Nielsen y Toft, 2008). El signo clínico característico de la PTB bovina es la diarrea, inicialmente intermitente y luego profusa e incoercible, pérdida progresiva de peso corporal y del estado general.

Actualmente la prueba de diagnóstico más frecuentemente usada es la prueba por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) en suero sanguíneo. Esta prueba presenta varias ventajas, como por ejemplo, el requerir una sola visita al establecimiento para tomar las muestras a analizar, las que podrán ser congeladas y conservadas hasta su análisis, facilitando así, el transporte al laboratorio, la automatización de la prueba, su repetibilidad, la posibilidad de evaluar múltiples muestras al mismo tiempo y la rápida obtención de los resultados. (Vannuffel y cols., 1994).

La prueba de ELISA se aplica fundamentalmente en animales mayores de tres años y la certeza diagnóstica corresponde al estadio en el que el animal presenta signos de diarrea y edema submandibular, período donde la eliminación de MAP por materia fecal y/o leche es cuantitativamente importante. Puede aplicarse tanto en suero como en leche, aunque la correlación entre ellas es moderada. La concentración de anticuerpos varía según el periodo de lactación, existiendo concentraciones altas al principio y al final de la lactación.

Desde el descubrimiento en 1989 de la secuencia de inserción IS900 en el genoma de MAP (Green y cols., 1989; Collins y cols., 1989), los investigadores han propuesto la utilización de esta secuencia en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite identificar pequeñas cantidades de ADN de MAP en una muestra.

Las pérdidas económicas por PTB se clasifican en directas: debidas a la reducción de las producciones cárnica y láctea, disminución de la fertilidad (Kennedy y Benedictus, 2001), e indirectas por el incremento en la incidencia de mastitis y otras enfermedades infecciosas en el animal infectado, menor expectativa de vida productiva de la hembra, eliminación prematura de animales, menor valor comercial de canales y aumento de los costos de reemplazo en el rebaño, etc. (Kennedy y Benedictus, 2001; Ayele y cols., 2001, Holzmann y cols., 2004, Weber y cols., 2006; Pillars y cols., 2009).

Estudios realizados en Argentina estimaron una reducción productiva cárnica y láctea aproximada de 19%, con una estimación de pérdidas económicas de 22 millones de U\$S para la zona de cría de la Cuenca del Salado, y de 6.3 millones de U\$S para las cuencas lecheras de la provincia de Buenos Aires (Paolicchi y Romano, 2007). Las pérdidas en los Estados Unidos de América fueron estimadas en 700 Kg de leche/vaca/año y entre 200-250 millones USD/año (Coussens, 2004; Losinger, 2005).

El objetivo de esta tesis de maestría fue evaluar el impacto sobre la producción láctea (cantidad y calidad) en hembras bovinas en lactación debidas a la infección por MAP.

1.2. Marco Conceptual, Objetivos e Hipótesis

1.2.1.- Enfermedad de Johne o paratuberculosis

1.2.1.1.- Etiología

El MAP pertenece al género *Mycobacterium*, familia *Mycobacteriaceae*, suborden *Corynebacterineae*, orden *Actinomycetales*, subclase *Actinobacteridae* y clase *Actinobacteria* (Bergey y cols., 1923).

El MAP es un patógeno intracelular facultativo, Gram positivo, cuya temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C (Chacón y Barletta, 2010). Su crecimiento lento requiere de varias semanas de incubación antes que sus colonias sean detectadas en los medios de cultivo. El MAP, es un bacilo (0.5 x 1.5 µm), aerobio e intracelular facultativo. Posee pared celular cerosa rugosa con una estructura trilaminar, compuesta densamente por una mezcla cética de lípidos únicos y polisacáridos. La baja actividad metabólica y la compleja pared celular le otorgan resistencia frente a condiciones ambientales adversas. Puede sobrevivir 5 meses en agua de río y 9 meses en aguas de laguna (Holzmann y cols., 2004), entre 5 y 11 meses en materia fecal (MF) y 1 año a -14°C (Kazda, 2009). Los suelos húmedos, con pH ácido y alto contenido en turba favorecen su sobrevivencia (Johnson-Ifearulundu y Kaneene, 1997; Manning y Collins, 2001).

La supervivencia intracelular de MAP se debe a su capacidad de alterar la maduración fagosomal, evitar la acidificación progresiva de este compartimiento y su fusión con los lisosomas (Kuehn y cols., 2001).

Es un microorganismo capaz de infectar a una gran variedad de especies animales, entre ellos los animales de producción de los cuales se destacan los bovinos, ovinos, caprinos y camélidos.

1.2.1.3- Epidemiología

La PTB, es una enfermedad que afecta la producción bovina, no es fácilmente detectable a través de los signos clínicos y presenta una sintomatología subclínica inaparente que enmascara el futuro de la enfermedad; esta enfermedad produce pérdidas en la actividad ganadera tanto en lechería como cárnica, sólo algunos países de Europa, Estados Unidos y Australia cuentan con un programa sanitario.

La prevalencia de PTB en Europa oscila entre un 7% y un 55%, en Estados Unidos un 40% de los rodeos de más de 300 cabezas están infectados y en Australia la prevalencia en rodeos lecheros es entre un 9% y un 22%. En el cuadro 1.1 podemos observar las prevalencias de PTB en los rodeos de algunos países de Europa.

Cuadro 1.1. Prevalencias de paratuberculosis en los rebaños bovinos de algunos países de Europa

País	Año	Prevalencia
Alemania	2004	42%
Bélgica	1998	18%
Dinamarca	1998	55%
Francia	1999	68%
Italia	2001	65%
Reino Unido	1995	17%

Tomado de Nielsen y Toft (2009).

En el Perú (Cano, 2009), en un trabajo realizado en la región de Lima, se encontró una seroprevalencia corregida del $6,9 \pm 3.3\%$ en animales con anticuerpos contra MAP. Benito y Rivera (1999) para la misma región, reporta una prevalencia de 29%, pero con diferentes poblaciones y con diferentes pruebas diagnósticas.

1.2.1.4.- Factores de susceptibilidad

○ Edad:

Los animales más susceptibles a la infección son los menores de 6 meses de vida, especialmente en los primeros 30 a 60 días por la inmadurez inmunológica, el desarrollo de las placas de Peyer (Takanashi y cols., 2008) y el nivel de exposición a MAP (Marcé y cols., 2011), a pesar de que los signos clínicos se presentan en animales mayores a 3 años de edad. La susceptibilidad disminuye con la edad, pero también depende del estado fisiológico, inmunitario, nutricional y la carga bacteriana. Aunque con la edad desarrollan resistencia, algunos animales adultos pueden infectarse si hay suficiente carga bacteriana en el ambiente, pero raramente desarrollan los signos clínicos porque generalmente se descartan antes por problemas reproductivos o edad avanzada.

○ Número y momento de lactación:

Las hembras lecheras de alta producción y en el pico de lactancia tienen un alto riesgo de infección (Jakobsen y cols., 2000). Esto es debido a que una alta producción genera una disminución en el sistema inmunológico, así mismo los animales con una lactación prolongada (mayor a 305 días), son obligados a producir más de lo normal convirtiéndolos en blancos para la enfermedad.

○ Estrés:

En situaciones de estrés, el animal infectado puede empezar a eliminar las micobacterias en heces y más adelante manifestar la diarrea (Soberón, 2011). Convirtiéndose así en una fuente de infección para los demás animales.

1.2.1.5.- Transmisión:

La principal forma de transmisión es cuando el ternero recién nacido está expuesto a las ubres contaminadas con materia fecal o directamente por la ingesta de calostro o leche de vacas infectadas. La transmisión transplacentaria también puede

ocurrir en el útero de una vaca positiva ya sea vientre natural o receptora de una transferencia embrionaria (Manning y Collins, 2001).

1.2.1.6.- Resistencia y persistencia:

En comparación con otras bacterias, incluidas el resto de micobacterias, MAP se caracteriza por su extremadamente baja actividad metabólica, lo que conlleva una velocidad de crecimiento en condiciones óptimas 24 veces inferior que la de bacterias como *Escherichia coli* (Juste y cols., 2009).

Es capaz de sobrevivir en agua corriente con pH no neutro hasta 14 meses (Larsen y cols., 1972) y en agua destilada hasta 15 meses, reduciéndose la concentración inicial en 1 Log10 cada 68.5 días (Sung y Collins, 1998). También permanece 55 semanas en ambientes secos y sombríos, y 48 semanas en agua de presa no expuesta a luz solar. La supervivencia en heces puede llegar hasta los 246 días (Lovell y cols., 1944), en purines hasta 287 días (Jorgensen, 1977) y entre 21 y 28 días durante la digestión anaeróbica de purines de una planta de biogás (Olsen y cols., 1985), aunque supuestamente la mezcla de heces y orina produce un efecto bactericida (Chiodini y cols., 1984). Además, su resistencia le permite soportar tratamientos de esterilización aplicados a la leche y al agua destinada al consumo humano (Whan y cols., 2001).

Por el contrario, parece sensible a la luz solar, las altas temperaturas, la desecación, la elevada concentración de calcio y el hervido (Merkal y Cullogh, 1982).

1.2.1.7.- Patogenia:

La patogénesis describe la manera en la cual el patógeno ingresa al cuerpo del hospedador, se multiplica para poder ser liberado y diseminarse por el medio ambiente, mientras el hospedador está en la lucha de disminuir los daños.

La forma en la cual hay más porcentaje de certeza por la cual el microorganismo ingresa al cuerpo del hospedador es la vía oral, la susceptibilidad de los animales jóvenes estaría relacionada con el gran tamaño de las placas de Peyer, las cuales se van reduciendo a medida que el animal crece, ya que este es el punto de entrada al organismo (Momotami y cols., 1988).

Se ha hallado evidencia en la enfermedad en terneros, que el rumen tiende a mostrar un engrosamiento de las vellosidades, con pérdida de la arquitectura normal; y el abomaso puede presentar un tamaño del 75% en relación a una ternera sana. En el intestino delgado, desde yeyuno, duodeno e íleon, la mucosa tiende a estar congestionada en algunas zonas y en otras con presencia de equimosis y sufusiones.

La patología conduce a un engrosamiento del epitelio en la parte baja del intestino, causa mala absorción de nutrientes, y eventualmente la muerte de los animales afectados (Berger y cols., 2006).

El engrosamiento de la pared intestinal principalmente en el íleon es el rasgo característico en los bovinos, las mucosas se presentan edematosas tumefactas, con aspecto carnosos, formando gruesos pliegues, que pueden presentar grietas, áreas congestivas, petequias o ulceraciones (Blood y Radostis, 1989).

Específicamente la parte del intestino delgado más afectada por esta enfermedad es el íleon en donde se deberían absorber los nutrientes digeridos en las porciones anteriores por las enzimas digestivas, biliares y pancreáticas; en esta zona en un animal sano se encuentran una serie de pliegues que están cubiertos por vellosidades digitiformes, la presencia de esta enfermedad produce una atrofia y fusión de estas vellosidades lo que conduce a un síndrome de mala absorción e hipoproteinemia (Liyong

y *cols.*, 2008), ya que es en esta zona de la mucosa intestinal donde se realiza la absorción de aminoácidos provenientes de las proteínas de la dieta.

Es mínima la cantidad de nutrientes absorbidos volcados a la red linfática y capilar para su transporte a los tejidos donde se realiza el metabolismo intermedio, la glándula mamaria también capta en forma mínima aminoácidos circulantes en especial los esenciales, para sintetizar proteínas propias de la leche como la caseína, alfa-lactoalbúmina (α -LA) y beta-lactoglobulina (β -LG) (Trinchero y *cols.*, 2013). Lo que haría suponer que los animales infectados tendrían menor cantidad de dichas sustancias por la baja cantidad de aminoácidos.

La glucosa sintetizada en el hígado es la responsable de los niveles de glucemia en los rumiantes (40-60% m/v; Trinchero y *cols.*, 2013), los animales con sintomatología clínica de paratuberculosis al enfrentar periodos avanzados, presentan linfonódulos en el hígado lo que podría ocasionar una disfunción en la gluconeogénesis, e inducir una disminución de la producción de lactosa.

La micobacteria se ubica en fagosomas o endosomas inmaduros de los macrófagos del bovino, con mayor preferencia en las placas de Peyer ileales y yeyunales (Corpa y *cols.*, 2000), después de atravesar la mucosa. De esta manera se inicia el estadio asintomático o silencioso de 2 años o más (Chiodini, 1996).

Según avanza la enfermedad los fagocitos infectados diseminan las micobacterias por diferentes partes del cuerpo vía sanguíneos y linfáticos. (Lugton, 1999). Pudiendo localizarse en la sangre, el hígado, nódulos retrofaríngeos y mandibulares, bazo, pulmones, riñones, ubres, glándulas mamarias, útero, epidídimo y semen. (Ayele y *cols.*, 2004). Una vez que las bacterias lograron entrar, son transportadas dentro de la célula de manera libre en leucocitos dentro de vacuolas, y posteriormente se introducen en fagosomas de macrófagos sub e intra epiteliales adyacentes a la placa de Peyer (Tessem y *cols.*, 2001). La supervivencia y replicación de MAP dentro de los macrófagos depende del grado de activación y diferenciación de los mismos. Los macrófagos migran hacia los linfonódulos mesentéricos desencadenando una respuesta inmune celular, atrayendo nuevos macrófagos al sitio de la lesión para evitar que progrese la lesión de la infección, originando un granuloma difuso (Coussens, 2004) Esta fase también es conocida como tuberculoide, la cual coincide con el estadio subclínico donde los animales son bajos excretores fecales y en leche (Coussens, 2004). La respuesta inmune celular al transcurrir los años pasa a ser reemplazada por la respuesta inmune humoral, lo que favorece su diseminación por la vía linfática y sanguínea.

La fase lepromatosa se caracteriza por las lesiones granulomatosas extendidas a la lámina propia adyacente y otras zonas del intestino, lo que se conoce también como el estadio clínico y avanzado, se detecta una abundante excreción fecal, y se produce el síndrome de la mala absorción (Chiodini, 1996).

1.2.1.8.- Manifestaciones Clínicas:

El signo patognomónico de la enfermedad es la diarrea e intermitente, a causa del síndrome de mala absorción lo que causa una pérdida de peso es decir una disminución del estado corporal, además de la disminución de la producción láctea, presencia de mastitis e infertilidad.

Podemos distinguir cuatro marcados estadios:

- Infección latente:

También llamado estadio silencioso se presenta en terneros, novillos y vacas hasta los dos años, no presentan signos clínicos o algún cambio sobre su peso corporal o estado físico, pero los animales si pueden excretar la bacteria. Las pruebas diagnósticas difícilmente permiten detectar la infección, sin embargo en algunos pocos casos se puede cultivar el agente a partir de heces o demostrar su presencia en tejidos.

- Enfermedad subclínica:

Son los portadores adultos, no presentan signos clínicos pero pueden presentar otras anomalías, como mastitis o infertilidad. Durante el estadio subclínico, los síntomas que pueden llevar a su sospecha son principalmente pérdidas de producción, que en bovino lechero como ya se ha mencionado puede variar de un 4 hasta un 14% de leche dependiendo de la lactación en que se encuentre (Benedictus y cols., 1985). El cultivo de heces será negativo en la mayoría de los casos, siendo solo positivos entre el 15 y 25%. Las pruebas serológicas podrían resultar negativas en su minoría, y si los animales no se sacrifican la enfermedad pasará al siguiente estadio.

- Enfermedad clínica:

Considerada la punta del iceberg ya que se hace referencia a los pocos casos sintomáticos en comparación al número total de individuos infectados. Los signos clínicos comienzan a aparecer después de los 2 años de edad, siendo más frecuentes entre los 2 y los 6 años coincidiendo con los partos y el inicio de las lactaciones, y aunque en pequeños rumiantes pueden comenzar antes, su aparición también está asociada a la introducción de estos estreses (Chiodini y cols., 1984).

Son casos esporádicos debido a la lentitud con que se disemina la enfermedad. Se observa pérdida gradual de peso, y condición corporal (Taylor, 1945) pero el apetito es normal. Varias semanas después se presentaran cuadros de diarrea y disminuirá más evidentemente la producción láctea, mientras que las constantes fisiológicas permanecerán normales (Frecuencia Cardíaca 40-80, Frecuencia Respiratoria 10-30, Temperatura 37.7°-39°C.).

- Enfermedad clínica avanzada:

Conforme va avanzando la enfermedad, la emaciación es el signo más evidente, acompañado de edema intermandibular, que generalmente desaparecerá al iniciar las diarreas, que se observan como heces líquidas expulsadas a chorro. La enfermedad puede durar de semanas hasta meses, pero siempre terminará en deshidratación grave, emaciación y debilidad, por lo que es necesario el sacrificio del animal.

1.2.1.9.- Lesiones a la necropsia

La pared intestinal tiene un grosor cuatro veces superior al normal, con la mucosa arrugada y linfonódulos de la serosa muy engrosados. Presenta unas mucosas edematosas, tumefactas, con aspecto carnosos, formando gruesos pliegues, que pueden presentar grietas, áreas congestivas, petequias o ulceraciones (Buergelt y Duncan, 1978).

La válvula ileocecal presenta enrojecimiento de bordes que puede convertirse en edema con engrosamiento y degenerar en una posterior formación de arrugas. Los linfonodos mesentéricos e ileocecales se encuentran engrosados y edematosos. Se observan al microscopio grandes cantidades de macrófagos epitelioides y células gigantes multinucleadas en lámina propia y submucosa en los segmentos afectados del

intestino, con frecuencia se observa linfangitis granulomatosa. En casos avanzados se observa una elevada incidencia de arteriosclerosis.

1.2.1.10.- Diagnóstico

Las pruebas de diagnóstico para detectar la infección de MAP, pueden ser categorizadas en las que identifican el microorganismo, y en aquellas que identifican la reacción inmunológica

El diagnóstico de la PTB bovina puede realizarse por los signos clínicos, estudios anatomohistopatológicos, identificación del agente causal o por pruebas inmunológicas. El resultado de dichas pruebas depende del estadio de la enfermedad y la prueba de referencia utilizada. (Nielsen y Toft, 2008)

El diagnóstico de la PTB es un desafío pues la efectividad de las pruebas diagnósticas depende directamente del estadio clínico en el que se encuentre el animal. Los animales en el estadio silencioso y subclínicos se caracterizan por una alta respuesta inmune celular, mientras en estadios clínicos y avanzados predomina la respuesta inmune humoral. Los animales con PTB avanzada desarrollan un estado de anergia, donde las pruebas diagnósticas son menos sensibles.

Dentro del diagnóstico clínico se pueden destacar animales de 4 años o más con adelgazamiento corporal, y probable disminución láctea, la diarrea es acuosa e intermitente, (Chiodini y cols., 1984). Los casos clínicos previamente descritos solo representan el 1% de los casos presentes en el tambo. En esta circunstancia son sugerentes los datos de descenso de la producción láctea, susceptibilidad a trastornos reproductivos o mayor incidencia de mastitis en rodeos lecheros (Chiodini y cols., 1984).

Los animales clínicamente infectados son grandes excretores y tienen una respuesta inmune humoral detectable por las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), inmunodifusión en gel de agar (AGID) y la fijación del complemento (CFT).

Dentro del diagnóstico inmunológico, específicamente inmuno-enzimático, se encuentra la prueba de ELISA para detectar anticuerpos, se aplica fundamentalmente en animales mayores de tres años y la certeza diagnóstica corresponde al estadio en el que el animal presenta signos de diarrea y edema submandibular, período donde la eliminación de MAP por materia fecal y/o leche es cuantitativamente importante. Puede aplicarse tanto en suero como en leche, es el de mayor disponibilidad y el más ampliamente utilizado para establecer la situación de la paratuberculosis en los hatos (Tiwari y cols., 2006).

La técnica ELISA es, hasta el momento, la prueba más sensible y específica para los ensayos de anticuerpos séricos contra *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* en el ganado bovino. Su sensibilidad es comparable con la de la prueba de cultivo fecal (FC) en los casos clínicos, pero es mayor que la de la FC en portadores asintomáticos. (OIE, 2008) La especificidad de la prueba ELISA se incrementa mediante la absorción de sueros a *M. phlei*.

Mediante el ELISA se detecta aproximadamente el 30–40% del ganado bovino identificado como infectado por el cultivo de heces en medios sólidos (Whitlock y cols., 2000). De modo similar a los métodos de cultivo, la sensibilidad del ELISA depende del nivel de liberación de MAP en las heces y de la edad del animal. Un amplio estudio realizado en Australia demostró que la sensibilidad real del ELISA en el ganado bovino entre 2 y 4- años de edad fue del 1,2%, 8,9% y 11,6%, respectivamente, y permaneció entre el 20 y 30% en los grupos de más edad. Se ha calculado que, globalmente, la

sensibilidad real para todos los grupos de edad es de aproximadamente el 15% (Jubb y cols., 2004).

La concentración de anticuerpos varía según el periodo de lactación, existiendo concentraciones altas al principio y al final de la lactación.

1.2.1.11.- Tratamiento y control

Son escasos los estudios de susceptibilidad a antimicrobianos a causa del elevado costo, la prolongada duración de los ensayos, el mantenimiento de animales portadores y la prohibición del empleo de determinados fármacos en animales destinados a consumo humano (Collins, 2010). Algunos de estos estudios *in vitro* demostraron la sensibilidad de MAP a ciertos antibióticos (estreptomicina, ciprofloxacina, etambutol, dapsona, rifabutina y claritromicina), atenuando el cuadro clínico y las lesiones macroscópicas, sin eliminar la infección (Zanetti y cols., 2006; Shin y Collins 2008). Por lo cual, la antibioticoterapia mantiene los animales como reservorios de MAP, situación ya enunciada por Merkal y Larsen (1973).

Una serie de países han desarrollado programas de sanidad animal con apoyo del gobierno, para proporcionar ayuda logística, administrativa y financiera, con el fin de controlar esta enfermedad. La enfermedad de Johne se ha convertido en una enfermedad que requiere un programa nacional de control, debido a la creciente evidencia y a la preocupación por las pérdidas de producción y las posibles restricciones internacionales del ganado.

La falta de tratamientos y pruebas diagnósticas certeras para el control de esta infección, impone la ejecución de medidas de prevención para evitar la introducción y transmisión de MAP al establecimiento (Harris y Barletta, 2001).

Entre estas medidas, son importantes las prácticas de bioexclusión para evitar el ingreso del microorganismo (MO) al establecimiento a través tanto de material biológico (ingreso de animales de reposición, control de la fauna silvestre, etc.) como no biológico (agua de afluentes, fómites, etc.).

Así también son significativas las tácticas de gestión interna enfocadas a mantener buenas prácticas de limpieza y desinfección de las instalaciones (áreas de partos, separación temprana de las crías y sus madres, etc.) a fin de disminuir y evitar la diseminación de MAP dentro del establecimiento. Se debe recordar que una correcta gestión interna se logra a través de una adecuada capacitación del personal del establecimiento.

1.2.2.- Importancia productiva y económica

La paratuberculosis causa pérdidas económicas a través de la disminución en la producción de leche, la que varía de un 14,6 % a un 15,9%, alcanzando hasta un 19,5% en la última lactación (Buergelt y Duncan, 1978, Benedictus y cols., 1987, Spangler y cols., 1992).

En la penúltima lactación de animales con paratuberculosis subclínica, se ha observado una reducción en la producción de leche del 4-6% (Nordlund y cols., 1996), ascendiendo la pérdida hasta un 14% en la última lactación antes del sacrificio (Benedictus y cols., 1987, Wilson y cols., 1993). Sin embargo, según Johnson y su grupo de trabajo (2001), en rebaños con una media de dos partos o menos, las pérdidas de producción lechera apenas tienen importancia.

Al ser esta una enfermedad que afecta la absorción de nutrientes, los animales consumen normalmente su ración subutilizándola porque se produce una reducción de

la conversión del alimento, por lo que su condición corporal comienza a deteriorarse a medida que la enfermedad progresa, incremento en los honorarios veterinarios y los medicamentos inútilmente administrados por el error del diagnóstico, los reproductores comienzan a carecer de valor. Finalmente en la fase crónica provoca la muerte del ganado infectado.

Se puede también nombrar muchas más pérdidas inaparentes, como la eliminación prematura de animales infectados, menor valor comercial de canales (Collins, 2010) puesto que disminuyen su condición corporal, ya sea en la industria cárnica, o en la industria láctea, el incremento de la tasa de descarte, la reducción a la mitad de la expectativa de la vida productiva, se genera la pérdida de inversión en el stock de reposición que ha sido infectado o expuesto desde el nacimiento, con lo cual se limita la diversidad genética, el aumento de los costos de reposición, se genera un periodo improductivo desde el descarte hasta que el animal de reemplazo comienza a producir, se incrementa en la susceptibilidad a otras enfermedades y problemas reproductivos, se disminuye la ganancia de peso y en el valor de recupero en el frigorífico, y se produce una pérdida de marketing en los animales destinados a venta.

La mayor pérdida económica en los establecimientos con alta prevalencia es la reducción de la producción láctea, tanto en cantidad como en porcentaje de grasa y de proteínas (Gonda, y cols., 2007; Pillars y cols., 2009). La producción láctea puede descender entre un 15% a 20%; según el estadio de la enfermedad y número de lactancia (Spangler y cols., 1992; Nordlund y cols., 1996).

En animales en estadios clínicos y/o avanzados se estima una pérdida de 573 kg y de 1.273 kg en la 1ª y 5ª lactancia, respectivamente (Benedictus y cols., 1987; Van Leeuwen y cols., 2002). Wilson y cols., (1993), Beaudeau y cols., (2007), Aly y cols., (2010), entre otros, informan que los animales infectados con MAP presentan un descenso en su producción láctea en relación a los animales no infectados. Otros estudios informan la falta de diferencia de producción entre ambas categorías (Johnson y cols., 2001; Pillars y cols., 2009), mientras que otros investigadores registran una alta producción láctea alrededor de los dos años de edad en los animales infectados (McNab y cols., 1991).

Similares contradicciones se informan en estudios referidos a la composición de la leche (contenido en grasa y proteína), recuento de células somáticas y presencia de anticuerpos anti MAP, en animales infectados (McNab y cols., 1991; Gonda y cols., 2007; Baptista y cols., 2008).

1.2.2.1.- Consecuencias económicas de la PTB:

○ Disminución de la producción láctea:

Las vacas altas productoras clínicas positivas a PTB, son desechadas antes de su segunda gestación puesto que la disminución láctea es de 19.5% (Benedictus y cols., 1987).

La magnitud de la asociación entre la infección subclínica y la producción de leche depende del número de lactancias del animal así como de la etapa de la enfermedad y por ultimo del periodo de lactancia, ampliamente estudiados en esta investigación.

Jonson- Ifearulundu y Kaneene en 1997 mencionaron que la evaluación de la enfermedad subclínica en la producción, debe considerar un promedio del número de partos de la muestra de la población. En hatos que tienen un promedio de número de partos de 2 o menos, la infección subclínica puede tener un pequeño impacto en la

producción, puesto que la prevalencia de la enfermedad no es tan alta para animales jóvenes, disminuyendo el impacto en la producción láctea.

- Muerte de animales.

Chiodini en 1984 estimó que las pérdidas de animales adultos, se encuentran entre un 3 a 10% por paratuberculosis. El costo económico debido a la mortalidad se estima al determinar la diferencia entre el valor al desecho de los animales con paratuberculosis y el costo de la adquisición de vaquillas de reemplazo.

- Desechos prematuros.

Los desechos prematuros ocasionan pérdidas de material genético, aumentan el número de animales eliminados voluntariamente, por lo que aumentara el costo por incremento del rodeo y sobre todo de animales de reemplazo.

La eliminación temprana de animales en un rodeo infectado con paratuberculosis, se puede deber a: un control de la enfermedad, presencia de animales falsos positivos, predisposición a otras enfermedades (por la inmunosupresión), la cual no permite a los animales alcanzar su máximo pico de producción o fallas reproductivas.

- Fallas reproductivas.

Se encontró que existe un alta probabilidad de desechar animales que padecen paratuberculosis bovina en forma subclínica, (Buergelt y Duncan, 1978) por problemas de infertilidad. Además el intervalo entre partos se alarga en animales asintomáticos. Esto se puede deber al incremento de balance energético negativo, por la emaciación a consecuencia de la PTB (Johnson y cols., 2001).

- Costos médicos:

Esta patología no tiene tratamiento, los animales pueden mejorar por cierto tiempo, pero vuelven a decaer con los mismos síntomas y además continúan eliminando el agente. Muchos casos subclínicos pueden obtener un diagnostico incorrecto al no presentar signos de paratuberculosis bovina, siendo tratados sin ningún sentido, aumentando los costos médicos.

El tamboero necesitará de la visita de un médico veterinario para realizar el diagnostico lo que representa un costo extra.

- Costos por el diagnóstico.

Para realizar el diagnostico se puede realizar la prueba de ELISA, PCR y/o cultivo bacteriológico. Estos procedimientos tienen un costo que aumentaría la pérdida económica de esta enfermedad.

1.2.3.- Composición de la leche

La leche es el producto normal de la secreción de la glándula mamaria, es un alimento nutritivo que está compuesto por caseína, lactosa, grasa y vitaminas. La composición de la leche bovina varía considerablemente según la raza, el estado o momento de lactancia, alimento, entre otros factores.

A pesar de estas variaciones las relaciones entre los componentes suelen ser muy estables por ejemplo la densidad normal varía entre 1,023 a 1,040 (Wattiaux y Armentaño, 2002), pudiendo así detectar algún tipo de adulteración.

La glándula mamaria para producir leche, tiene que llevar a cabo por lo menos tres funciones en su células epiteliales; las cuales son i) obtener energía para realizar su trabajo, donde la mitocondria juega un papel muy importante; ii) elaborar los componentes de la leche que no provienen directamente de la sangre; y iii) regular la

cantidad de los diferentes elementos que integran la leche (Bath, y cols., 1979). Se considera que pasan por la glándula aproximadamente 500 volúmenes de sangre o 375 volúmenes de plasma por cada volumen de leche que se produce (Bath, y cols., 1979).

Se puede decir que en la leche, la proteína está constituida por la caseína, y el plasma por la albúmina y la globulina (Dukes, 1977). En el cuadro 1.2 se encuentra la distribución de componentes propuesta por Iturbe (2012).

Cuadro 1.2. Composición de la leche bovina (agua, grasa, lactosa, minerales y proteína) expresada en gramos por litro (g l⁻¹). Composición de la proteína total tomando en cuenta la caseína y las proteínas del suero. Composición de las proteínas del suero expresadas en gramo por litro (g l⁻¹) y en porcentaje

1 Litro de leche	(g l ⁻¹)	%	
Agua	879,00		
Grasas	34,00		
Lactosa	47,00		
Minerales	7,00		
Proteína total	33,00	100,00%	
Caseínas	26,0	79,50%	
Proteínas del suero	6,3	19,30%	100%
Alfa lactoalbúmina	1,9	5,82%	30%
Beta lactoglobulina	3,3	10,11%	52%
Seroalbúmina	0,4	1,23%	
Inmunoglobulinas	0,7	2,14%	

Iturbe (2012)

1.2.3.1.- Síntesis de proteína.

Las caseínas lácteas son sintetizadas a partir de aminoácidos que son asimilados de la sangre bajo el control del material genético (DNA o ADN). Estas proteínas son envasadas en micelas antes de ser liberadas en el lumen de los alvéolos mamarios (Wattiaux y Armentaño, 2002).

La proteína de la leche de vaca está formada en un 2.7% por caseína y un 0.5% de proteínas del suero. (Valores respecto del total de la composición láctea). La caseína ocupa el primer lugar en cantidad y es importante para la estabilidad de las proteínas en la leche y tiene gran interés para la elaboración de productos derivados. Concretamente, las proteínas del suero suponen alrededor del 20% de las proteínas de la leche bovina (Baro y cols., 2001).

El suero lácteo está compuesto de proteínas importantes en el primer lugar en cuanto a cantidad tenemos a la β -lactoglobulinas (β -LA), en segundo lugar en cantidad en la leche es la α -lactoalbúmina (α -LA) (Cuadro 1.2). Una vez que las caseínas se han retirado de la leche y esta se ha vuelto ácida, la α -lactoalbúmina se puede separar por calentamiento para precipitarlas. El control genético de la leche sintetizada en el alvéolo proviene de la cantidad de la α -lactoalbúmina sintetizada por las células secretoras. Esta proteína es un regulador importante de la cantidad de lactosa y leche que se produce por día (Wattiaux y Armentaño, 2002).

- Beta-Lactoglobulina (β -LG)

La β -Lacto globulina (β -LG) representa cerca del 50% de la proteína del suero y el 12% de la proteína total de la leche de los bovinos. En el lacto suero se encuentra en una concentración de alrededor de 3-4 g l⁻¹ (Conrado y cols., 2005).

La β -LG está compuesta de una secuencia 162 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 18.4 kDa (Kontopidis y cols., 2004). Debido a su gran valor nutritivo puede ser usada para la fortificación de bebidas y jugos de fruta gracias a su gran solubilidad y estabilidad. (Grasselli y cols., 1997). Últimamente se demostró que β -LG presenta una mediana capacidad antioxidante respecto a la vitamina E y probucol, lo que incrementa su importancia a nivel nutricional (Lin y cols., 2007).

La β -LG interviene en el metabolismo de los ácidos grasos en las crías facilitando la acción de la enzima lipasas. (Perez y Calvo, 1995). Conjuntamente con su función nutritiva, se ha sugerido que regula el sistema digestivo. Además, cumple una acción antimicrobiana directa (Chaneton y cols., 2008).

- Alfa-Lactoalbúmina (α -LA)

Es una calcio metaloproteína que en las células del epitelio mamario forma un complejo con la β -1,4 galactosiltransferasa, para formar la enzima lactosa sintasa, la cual sintetiza lactosa en el interior de la vesícula secretora del aparato de Golgi. La formación de este complejo es necesaria para la síntesis de la lactosa. (Bawden y Nicholas, 1999) La lactosa es el principal carbohidrato de la leche. La α -LA es osmóticamente activa y regula el volumen de la leche producido. (Kuhn y cols., 1980). Posee otros efectos beneficiosos sobre la salud del ternero lactante debido a su elevada proporción de aminoácidos esenciales (triptófano y cisteína). En el lacto suero se encuentra en una concentración de alrededor de 1.5 g l⁻¹ (Conrado y cols., 2005).

- Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas son proteínas que forman parte del sistema de defensa contra microorganismos. La estructura básica, con forma de Y está constituida por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas (Konecny y cols., 1994). Unidas por puentes de sulfuros. En el lacto suero se encuentra en una concentración de alrededor de 0.6 - 0.9 g l⁻¹ (Conrado y cols., 2005).

Las inmunoglobulinas (Igs) son sintetizadas por el sistema inmune, y estas proteínas generalmente son extraídas desde la sangre. La permeabilidad de las células secretoras para las Igs es alta durante la síntesis de calostro, pero decrece rápidamente con el comienzo de la lactancia. Estas proteínas portan las propiedades inmunológicas de la leche y protegen a los pequeños mamíferos hasta que su propio sistema inmunológico esté desarrollado (Troncoso, 2014). La alteración de las mismas puede indicar del padecimiento por parte del animal (Hermida y cols., 1992).

- Seroalbúmina

La albúmina de la leche es la misma que se encuentra en la sangre, y procede de ella. Es una proteína relativamente grande, con una cadena formada por 528 aminoácidos (Walstra y Jenne, 1987). En el lacto suero se encuentra en una concentración de alrededor de 0,2-0,6 g l⁻¹ (Conrado y cols., 2005).

1.2.3.2.- Síntesis de grasa.

El acetato y el butirato producido en el rumen son utilizados, en parte, como las unidades de construcción de los ácidos grasos de cadena corta que se encuentran en la leche (Wattiaux y Armentaño, 2002). El glicerol necesario para unir tres ácidos grasos

en un triglicérido proviene de la glucosa. Cerca del 17-45% de la grasa en la leche se forma del acetato y 8-25% del butirato (Ruiz, 2010).

La composición de la dieta posee una influencia muy importante en la concentración de grasa. Los lípidos movilizados de las reservas corporales en el comienzo de la lactancia son unidades de construcción para la síntesis de grasa (Wattiaux y Armentano, 2002). Sin embargo, según Chilliard y cols., (2002), aproximadamente el 60% de los ácidos grasos presentes en la grasa láctea son captados de la sangre y el 40% son sintetizados en la glándula mamaria. Por lo tanto, la composición de la grasa de la leche puede encontrarse alterada por la manipulación del tipo de grasa en la dieta de la vaca (Troncoso, 2014).

1.3.- Objetivo General:

El objetivo del trabajo fue evaluar el impacto de la infección de MAP sobre la producción de leche (cantidad y calidad) a partir del estudio individual de las hembras en producción.

1.3.1.- Objetivos particulares

- 1) Identificar alteraciones del perfil proteico en leches de rodeos lecheros comerciales con aislamiento de MAP por cultivo y su identificación por PCR y/o con serología positiva a MAP por la prueba de ELISA-PPA desarrollado con antígeno comercial.
- 2) Analizar los datos productivos (identificación de alteraciones y asociaciones) de las hembras en producción positivas a ELISA-PPA en leche.
- 3) Analizar la asociación entre los parámetros productivos y las alteraciones encontradas en el punto anterior.
- 4) Realizar un ejercicio sobre los resultados económicos asociados con el desarrollo de esta enfermedad.

1.4.- Hipótesis General

El bacilo de la Paratuberculosis al ingresar a la barrera gastrointestinal, induce un engrosamiento en la mucosa y posterior atrofia de las vellosidades intestinales en la parte terminal del intestino delgado, causando una reducción del área de absorción, mala absorción de nutrientes, y alteración de la permeabilidad.

En virtud de lo anterior es esperable que:

1. La producción de leche se reduzca debido a que al disminuir el agua corporal se generaría un cuadro de hipovolemia (se necesita que circulen por la ubre entre 400 a 500 kg de sangre para producir 1 kg de leche), y esto atentaría contra la disponibilidad de nutrientes para usos metabólicos.
2. El síndrome de mala absorción produce hipoproteïnemia y en forma asociada se espera observar disminución de los sólidos totales y de proteína total ya que la glándula mamaria vería restringida su capacidad de captar los aminoácidos circulantes (en especial los esenciales).
3. Los animales infectados puedan ser identificados por la presencia de la respuesta inmune humoral en el suero de la leche.
4. Los animales que presentan anticuerpos en suero de leche produzcan menor cantidad de litros (por asociación entre las predicciones anteriores).
5. La infección afecta la composición de las fracciones de proteína láctea debido a la menor cantidad de aminoácidos circulantes captados por la glándula mamaria, esto disminuye la capacidad de síntesis de proteínas propias de la leche (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina), se espera que la disminución en las fracciones proteicas no sea homogénea.

CAPÍTULO 2

ALTERACIONES DEL PERFIL PROTEICO DE LA LECHE POR LA PRESENCIA DE MAP

2.1.-Introducción

La composición de las proteínas presentes en la leche, está asociada al proceso de secreción láctea (Schanbacher y Larry Smith, 1974). Se ha demostrado que se alteran por distintas patologías, como por ejemplo las mastitis registran una elevada concentración de proteínas en el suero sanguíneo, mientras las concentraciones de alfa-lactoalbúmina (α -LA) y beta-lactoglobulina (β -LG) se presentan reducidas (Hogarth y cols., 2004). Los datos de variación de α -LA y β -LG en el suero de leche no están muy estudiados, la influencia del estado de la infección de la glándula mamaria ha sido relacionado con la mastitis clínica y con infecciones experimentales subclínicas (Anderson y Andrews, 1977).

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad crónica intestinal, causada por *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP), la cual genera un síndrome de mala absorción en el intestino delgado, específicamente en el íleon, donde se produce una atrofia y fusión de las vellosidades ocasionando un cuadro de hipoproteïnemia, (Liyng y cols., 2008). Como consecuencia, podríamos suponer que la cantidad de nutrientes que ingresan a la red linfática y capilar estaría disminuida, por lo tanto se realizaría un metabolismo intermedio deficiente, afectando la llegada de aminoácidos circundantes especialmente los esenciales a la glándula mamaria, afectando la síntesis de proteínas propias de la leche como la caseína, alfa-lactoalbúmina (α -LA) y beta-lactoglobulina (β -LG). La composición de la leche en general puede ser afectada por aspectos sanitarios de la vaca, por lo tanto la proporción en la que se encuentran los distintos componentes en la leche no será constante (Alais, 1985; Casado y García, 1985).

La principal proteína del suero de leche es α -LA, juega un papel importante en la síntesis de lactosa en la glándula mamaria, y consecuentemente del incremento en el volumen de la leche producida. La α -LA es generada por las células epiteliales de la glándula mamaria sólo durante la lactación y forma un complejo con la enzima galactosiltransferasa, para formar la lactosa sintetasa, la cual cataliza el último paso de la biosíntesis de la lactosa en la glándula mamaria (Hill y Brew, 1975). Durante este proceso, la síntesis de α -LA regula el volumen de la producción de leche. Además α -LA posee un único sitio de unión ente el calcio y la proteína, lo que es muy conveniente para los estudios acerca de los efectos del calcio en la interacción de la proteína con otras proteínas, péptidos, membranas y compuestos orgánicos (Hiraoka y cols., 1980), actualmente se ha encontrado que algunas formas de α -LA pueden inducir apoptosis en células tumorales, lo que sugiere que esta proteína puede cumplir múltiples funciones biológicas (Svensson y cols., 1999).

En términos generales en este capítulo se analizó por la técnica de electroforesis el perfil proteico del suero de muestras de leche provenientes de rodeos libres e infectados por MAP y diagnosticados por PCR IS 900 en leche, ELISA (anticuerpos anti-PPA) en suero de sangre y Cultivo de MF.

El objetivo de este capítulo fue identificar alteraciones del perfil proteico en leches de rodeos lecheros comerciales con aislamiento de MAP por PCR y con serología positiva a MAP por la prueba de ELISA-PPA desarrollado con antígeno comercial.

2.2.- Materiales y Métodos:

2.2.1.- Origen de las muestras:

A partir de cuatro rodeos de la provincia de Buenos Aires. (Partidos de General Pueyrredón, General Viamonte y Lincoln) con un sistema de producción semi extensivo pastoril, se seleccionaron dos establecimientos libres y dos establecimientos infectados por MAP, según los siguientes criterios: libres cuando no presentaron ninguna característica de la enfermedad por los últimos 5 años y arrojaron resultados negativos en los diagnósticos complementarios, e infectados cuando tuvieron antecedentes clínicos de la enfermedad, o con serología positiva y/o aislamiento de MAP.

El total de muestras de leche (20) fueron obtenidas de bovinos en estado de lactación, de raza Holando Argentino, entre 4 y 10 años de edad; 10 de ellas provenientes de rodeos libres de MAP y 10 provenientes de rodeos infectados, sin signos clínicos compatibles con PTB, cursando el estadio I y/o II, se seleccionaron las muestras que cumplieron como requisito la positividad a ELISA en suero sanguíneo, PCR en leche individual y cultivo fecal (Anexo I) (muestras donadas por la Doctora Med. Veterinaria Liliana Gilardoni de su previa investigación, 2016).

2.2.2.- Acondicionamiento y preparación de las muestras de leche

De cada animal (un cuarto mamario anterior y de uno posterior) se tomaron las muestras de leche (50 ml por extracción manual post lavado de la ubre y despunte) en un recipiente estéril.

2.2.3.- Descripción de las técnicas usadas.

Cada muestra de leche fue centrifugada a 4°C durante 20 minutos (10.000 rpm), y se generó la precipitación de la caseína, por adición de ácido clorhídrico al 10%, a pH 4.6 separando a las proteínas del suero, obteniendo tres fracciones: grasa, suero lácteo y precipitado. Se retiró la capa grasa con la espátula de metal y se procedió a absorber el suero de leche. Este suero fue transferido a tubos cónicos de 15 ml, rotulados con el número de muestra y conservados a -20°C hasta su estudio.

Las muestras del suero de leche fueron procesadas por refractometría, la técnica de electroforesis y la estimación de las fracciones proteica realizada por densitometría.

a) Evaluación de proteínas totales

El valor de la proteína total (g l^{-1}) se obtuvo por refractometría. Para lo cual se colocó el refractómetro frente a una buena fuente de iluminación y una vez comprobado que los prismas estaban perfectamente limpios, con una pipeta Pasteur y sobre la superficie del prisma inferior (en posición horizontal), se colocó 1 o 2 gotas de suero problema, y se cerró el prisma. Se hizo incidir un haz de radiación y se observó por el ocular, con el acromatizador se corrigió la aberración cromática y a continuación se ajustó la medida del índice de refracción.

b) Electroforesis:

Acondicionamiento de la tira:

Las tiras de acetato de celulosa (Cellogel) se conservaron en metanol al 40%, por lo que fue necesario lavarlas primero con abundante agua y antes de sumergirlas en la cuba con el buffer de electroforesis Veronal sódico por 4 minutos. Se escurrió el exceso de buffer, se secaron las tiras con papel absorbente y se colocó la tira sobre el soporte de la cuba, con la superficie opaca hacia arriba, quedando bien fija y plana.

Siembra:

Se colocó con una pipeta 20 µl de muestra en un portaobjetos, con el sembrador se tomó la muestra y se colocó en la zona cátodo, se aplicó el volumen que carga en el espacio del sembrador. Se dejó secar y se realizó una segunda siembra sobre la sombra de la muestra sembrada anteriormente. La fuente de poder se reguló a 152 voltios por 45 minutos.

Revelado:

Una vez finalizada la corrida, se sumergió la tira 5 minutos en el colorante Amido schwartz o Negro de Amido (Anedra, Research, AG, Argentina) (0,5 g % diluido en metanol, agua, ácido acético proporción 4,5: 4,5: 1). Las tiras luego se decoloraron en solución decolorante (metanol, agua, ácido acético en una proporción 47,5: 47,5: 5), de tal manera que finalmente sólo retuvieron el color las bandas de proteínas.

Posteriormente se procedió a realizar la lectura en el densitómetro (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) ajustando la cantidad de proteína total para el cálculo de las fracciones proteicas. La figura 2.1 representa la lectura de las fracciones proteicas.

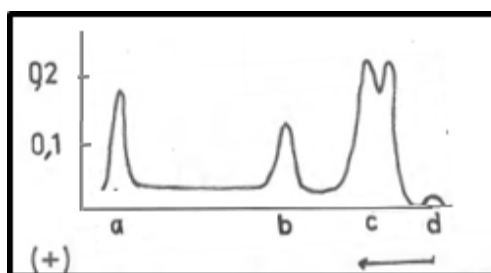


Figura 2.1. Representación gráfica de la densitometría láctea a: Inmunoglobulinas (Igs) b: α-LA, c: β-LG, d: seroalbumina (SA) (Fuente: J. Simal y cols., tomo XIX 1967).

2.2.4.- Análisis Estadístico:

Los resultados (concentraciones de Igs, α-LA, β-LG, y seroalbúmina) se analizaron por estadística descriptiva, calculando las medidas de tendencia central (media y mediana) y de dispersión (desviación estándar). (Anexo I). En todos los casos se verificó con los supuestos de independencia, normalidad y Homocedasticidad

Las diferencias entre tambos libres o infectados por MAP para cada una de las variables fueron testeadas por un análisis de varianza (ANVA) de acuerdo a un modelo completamente aleatorizado, utilizando el programa Infostat (Versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Las diferencias entre medias fueron declaradas significativas para $\alpha=0,05$.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : Variable observada en cada muestra.

μ : Media poblacional de la variable observada estimada por el promedio.

α : Efecto medio poblacional del estado de MAP sobre la variable analizada.

ϵ_{ij} : término de error aleatorio asociado a la observación Y_{ij} .

2.3.- Resultados

Los sueros lácteos fueron estudiados por electroforesis y los resultados medidos por densitometría de forma individual, detectándose diferencias en los patrones electroforéticos entre las muestras de leche provenientes de animales con resultado positivo y negativo a PCR en leche, ELISA en suero sanguíneo y cultivo fecal. La figura 2.2 muestra resultados representativos observados en las muestras positivas, en los cuales se observa una semejanza entre los niveles de α -LA y β -LG, similitud que difiere del patrón hallado para animales normales, donde la β -LG es aproximadamente el 50% del total de proteína sérica (Figura 2.3, notar la mayor concentración de β -LG respecto a la de α -LA).

Los resultados individuales de proteína sérica así como el diagnóstico mediante las diferentes pruebas a los que estuvieron sujetas estas pruebas se encuentran en el anexo I.

En el cuadro 8.1.1 tenemos los resultados del diagnóstico de tres pruebas (ELISA, Cultivo y PCR) realizado previamente por la Doctora Gilardoni, cada prueba

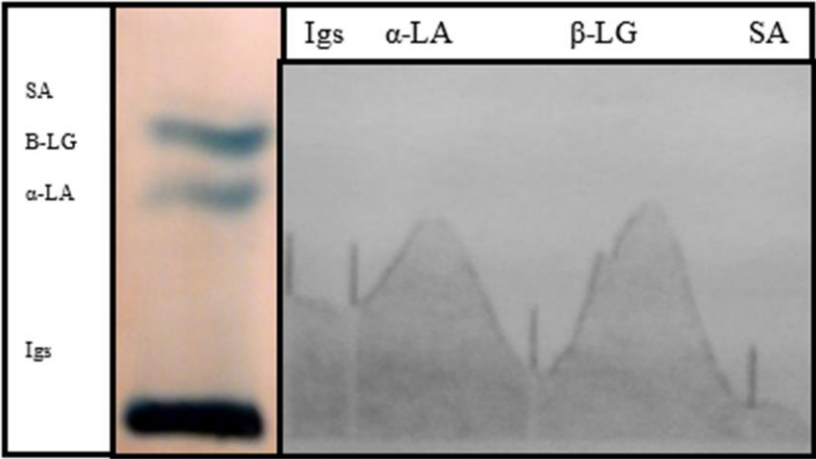


Figura 2.2. Resultados representativos de la electroforesis y lectura en muestras positivas.

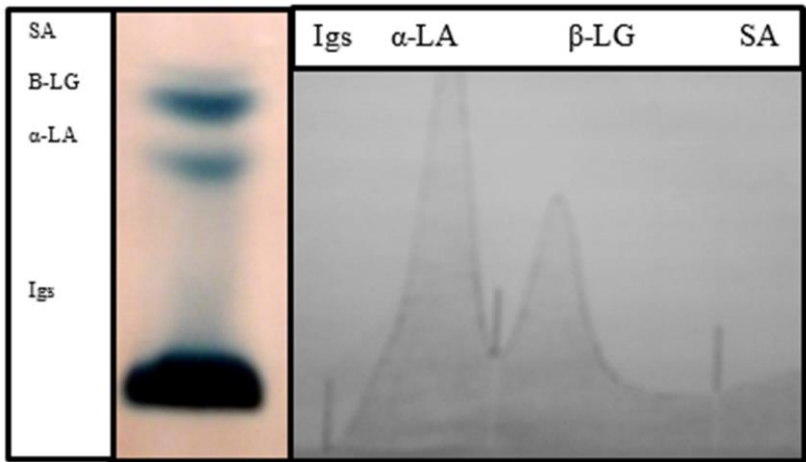


Figura 2.3. Resultados representativos de la electroforesis y lectura en las muestras negativas.

diagnóstica tiene una sensibilidad y especificidad diferente propia y para cada estadio de la enfermedad

El resultado del análisis de las muestras individuales de leche mostró que los animales no infectados o clínicamente sanos presentaron mayores concentraciones séricas ($p < 0,05$) en leche de proteínas séricas totales, α -Lactoalbúmina y β -Lactoglobulina (Cuadro 2.1). Por el contrario no se hallaron diferencias ($p > 0,05$) en las concentraciones de Inmunoglobulinas y seroalbúminas. Los histogramas correspondientes a cada variable se presentan en el Anexo I.

Cuadro 2.1. Comparación entre las concentraciones de las proteínas séricas presentes en la leche (g l^{-1}) de bovinos MAP positivos y negativos por PCR en leche

	Positivos	Negativos	EEM ¹	P-valor
Proteína sérica	3,48	5,77	0,38	0,005
Inmunoglobulinas	0,53	0,60	0,12	0,656
α -Lactoalbúmina	1,05	1,66	0,13	0,006
β -Lactoglobulina	1,77	3,40	0,30	0,001
Seroalbúmina	0,16	0,20	0,06	0,437

¹ Error estándar de la media

2.4.-Discusión

El objetivo central de este capítulo fue identificar alteraciones del perfil proteico en muestras de leche provenientes de rodeos comerciales con aislamiento positivo de MAP. Los resultados obtenidos permiten afirmar que el estado de infección modifica la composición proteica del suero lácteo.

La prueba de ELISA indirecta tiene una sensibilidad y especificidad de 36% y 87% respectivamente Gilardoni y cols., (2016), Whitlock y cols., (2000) y por Buergelt y Williams (2004). Los animales en estadios tempranos, con baja y/o intermitente excreción de MAP, generalmente no producen niveles detectables de anticuerpos (Badi y cols., 2010). Así es como la no detección de anticuerpos séricos no implica la ausencia de excreción de MAP por leche y/o MF (Whitlock y cols., 2000; Buergelt y Williams, 2004).

Evidentemente la infección de PTB tiene un impacto negativo sobre a la proteína sérica aún en animales subclínicos en los cuales la bacteria comienza a colonizar y lesionar las placas de Peyer en el intestino delgado (íleon) formando granulomas difusos, ocasionando una absorción deficiente de aminoácidos, (OIE, 2008) y por lo tanto una captación menor por la glándula mamaria, disminuyendo la capacidad de síntesis de estas proteínas séricas.

La α -LA y β -LG han sido ampliamente estudiados como biomarcadores de la función de la glándula mamaria (Bortree y cols., 1962; Kiddy y cols., 1968; Randolph y cols., 1969; Sinha y Mikolajcik, 1974; Harmon y cols., 1975; Anderson y Andrews, 1977). En el caso de la mastitis Hogarth, y cols., (2004) detectaron un aumento de la concentración de las proteínas totales (PT) en el suero sanguíneo, mientras concentraciones de α -LA, y β -LG se redujeron en el suero lácteo. Sin embargo, Caffin y Poutrel (1985) sólo identificaron la disminución de la concentración de α -LA en las muestras provenientes de leches mastíticas por coliformes. Según nuestro conocimiento estas alteraciones no han sido descritas para las leches provenientes de animales infectados por MAP.

La influencia del estado de la infección de mastitis clínica por *Streptococcus agalactiae* así como también por infección experimental, fue relacionada con la disminución de α -LA y β -LG, mientras que la seroalbúmina y las Igs aumentaron (Anderson y Andrews, 1977).

La concentración de proteína sérica láctea encontrada en este trabajo para los animales no infectados (MAP negativos) ($5,77 \text{ g l}^{-1}$) es coincidente con la reportada por Alais, en 1985 ($5,40 \text{ g l}^{-1}$) y Abd y cols. en el 2009 ($6,0 \text{ g l}^{-1}$). Por el contrario, para los animales MAP positivos se detectó una disminución en la concentración de proteína sérica láctea del 40% (promedio: $3,48 \text{ g l}^{-1}$). En otras investigaciones realizadas con suero sanguíneo se observa una disminución de proteína sérica sanguínea con la presencia de MAP (Begara-McGorum y cols., 1988, Fernández y cols., 2012).

Las concentraciones normales de β -LG en los rodeos PCR negativos fueron de $3,40 \text{ g l}^{-1}$ y se ubicaron dentro del rango considerado normal según diversos autores ($3 - 4 \text{ g l}^{-1}$; Conrado y cols., en el 2005; $2,5-4,0 \text{ g l}^{-1}$; Meza-Nieto y cols., en el 2006), mientras que para los animales positivos se observó una disminución del 52%.

De igual manera, el promedio de la concentración normal de α -LA fue de $1,66 \text{ g l}^{-1}$ resultado que coincide con lo reportado por Iturbe (2012, $1,2-1,5 \text{ g l}^{-1}$), mientras que los animales positivos presentaron una disminución del 37%.

Los resultados de Igs ($0,60 \pm 0,42 \text{ g l}^{-1}$) y seroalbúmina ($0,20 \pm 0,23 \text{ g l}^{-1}$) hallados en este trabajo se encontraron dentro de los rangos normales según Iturbe (2012, $0,50-0,70$ y $0,20-0,25 \text{ g l}^{-1}$ respectivamente).

La concentración de seroalbúmina en el suero de leche no resultó diferente entre animales infectados y libres de MAP. Una posible causa, podría ser debido a que esta fracción proteica no es sintetizada por las células epiteliales de la glándula mamaria, sino que son absorbidas desde la sangre y de ella depende la presión osmótica del suero.

También, es razonable especular que al provenir las muestras de animales en estadio subclínico, este parámetro fisiológico no se hubiera visto aún afectado por la patología. Algo similar ocurrió con la concentración de las inmunoglobulinas (Igs), que pese a verse reducida en los animales MAP positivos (20%), no se detectaron diferencias estadísticas significativas. La mayoría de Igs se producen a nivel sistémico pero hay un porcentaje de síntesis local proveniente del sistema inmune de mucosas representado por linfocitos B del tejido mamario. Estas células plasmáticas (productoras de Igs) proveen a la glándula mamaria una inmunidad local y la cantidad elevada presente en el suero puede deberse a una respuesta inmune a la presencia de enfermedades concomitantes (Fernández, 2012).

Por otro lado, es posible especular que considerando la variabilidad propia de este tipo de respuesta inmune de existir el efecto de la enfermedad sobre las concentraciones de Igs y seroalbúminas, simplemente no haya sido posible detectarse debido al escaso número de animales empleados.

2.5.- Conclusiones Parciales

Se lograron identificar las alteraciones del perfil proteico en las muestras de leche con aislamiento de MAP por PCR y con serología positiva a MAP por la prueba de ELISA (anticuerpos anti-PPA).

Se puede afirmar que: existe una relación entre la presencia de anticuerpos específicos a *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* en las muestras de leche y la disminución de la concentración de las fracciones de proteína del suero de leche, siendo las más afectadas las α -LA, β -LG en comparación con el resto de las proteínas del suero de leche.

**CAPÍTULO 3: ALTERACIONES DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE LA
PRODUCCIÓN DE LECHE EN PRESENCIA DE MAP IDENTIFICADA A
TRAVÉS DE ELISA PPA**

3.1.- Introducción

El desafío para quienes trabajan en el sector lechero no sólo es producir mayor cantidad de leche, sino optimizar su calidad, considerando los esquemas de alimentación, manejo y sanidad del ganado lechero. La calidad de la composición de la leche depende principalmente del aporte adecuado de proteína y energía en la dieta de la vaca en lactación. La cantidad de la leche está determinada por el número de células secretorias de leche y su actividad determina la producción, la forma y duración de la curva de lactancia. (Knight y Wilde, 1993; Pollot, 2000).

No todas las razas bovinas tienen la misma duración ni expresión de la curva de lactancia, en vacas Holstein de alta producción se ha observado que la dinámica celular y la producción láctea se han prolongado por 305 ± 6.4 días aproximadamente (Hernández, 2002). En este ciclo, el número de células secretorias aumenta al comienzo de la lactancia mientras que la producción de leche por célula baja. La producción de leche por célula aumenta significativamente a partir del pico de la lactancia y tiende a ser constante durante la lactación. El aumento de leche hasta el pico de la lactancia podría deberse a la continua diferenciación más que al aumento de número de células, mientras la disminución de leche después del pico probablemente sea debido a pérdida en el número de células secretorias debido al incremento en la tasa de muerte celular por apoptosis en la ubre, la cual fue descripta por Osterman, 2003.

La PTB es una enfermedad que afecta al ganado lechero ocasionando disminución en la producción de leche, donde la bacteria coloniza y lesiona las placas de Peyer en el intestino delgado (íleon) engrosando las vellosidades intestinales ocasionando la deficiente absorción de nutrientes (OIE, 2008), además de deteriorar su condición corporal a medida que la enfermedad progresa.

La condición corporal constituye un indicador preciso de las reservas de energía disponible por el animal para enfrentar cualquier proceso productivo. Existe una relación directa entre la condición corporal y la producción de leche (Corea y cols., 2008; Salgado y cols., 2008), es más por cada 30 kg de incremento de peso vivo se logra un aumento en la producción de leche de 122 kg, 8 kg de grasa y 4 kg de proteína durante las primeras 20 semanas de lactancia (Rearte, 1992). Sin embargo, los efectos de la condición corporal sobre los porcentajes de grasa y proteína en la leche son considerados pequeños (Hess y cols., 1999).

La composición de la leche está determinada por muchos factores, uno de los más importantes es la alimentación, la energía necesaria para el metabolismo de los rumiantes proviene básicamente de los ácidos grasos volátiles (AGV) producidos en el rumen por la diferente fermentación de los alimentos (Pereira y Armentano, 2000). Dependiendo de la composición de la dieta, a nivel ruminal ocurrirá una variación entre las proporciones de los ácidos acético y butírico, que son metabolitos precursores de una parte de la grasa en la leche, y el ácido propiónico que es el precursor de la lactosa de la leche y gran responsable del volumen de leche producido (Backes y cols., 2000).

La PTB, además de producir la mala absorción de aminoácidos, en el estadio sintomático, produce diarrea incoercible, al disminuir el agua corporal se genera un cuadro de hipovolemia, lo que podría reducir la producción de leche dado que demanda gran cantidad de nutrientes requiriendo que llegue a la ubre aproximadamente 400 a 500 kg de sangre para producir 1 kg de leche (Wattiaux y Armentaño, 2002). Además, esta patología podría reducir los sólidos totales y la proteína total o hipoproteïnemia, en esta situación la glándula mamaria captaría en forma mínima aminoácidos (AA) circulantes en especial los esenciales, para sintetizar proteínas propias de la leche como la caseína,

α -LA y β -LG. Por otro lado, la grasa butirosa, proviene de los componentes producidos en el rumen (Acetato, Butirato), encontrados como ácidos grasos de cadena corta en la leche, llegan al intestino en forma de ácidos grasos libres, y son hidrolizados por las lipasas pancreáticas e intestinales en el duodeno y absorbidos parcialmente por la mucosa intestinal. Debido a que la paratuberculosis afecta la absorción intestinal, la enfermedad aún en estadios subclínicos podría afectar la composición de la leche.

El conteo de células somáticas es el número de células por mililitro de leche, y constituye un indicador útil para medir la concentración de leucocitos en leche, y es comúnmente usado como un indicador de la salud de la glándula mamaria (Bradley y Green, 2005). Las células somáticas provienen de la sangre y del tejido de la glándula mamaria (Caravaca y cols., 2005). El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer datos claves sobre la función y el estado de salud de la glándula mamaria lactante y debido a su cercana relación con la composición de la leche y se considera un indicador muy importante de calidad de la leche (Wolter y Kloppert, 2004).

El recuento de células somáticas está descrito como un factor no relacionado con la presencia de anticuerpos de MAP, pero sugiere un incremento en el riesgo de transmisión cuando se alimenta animales con leche contaminada (Baptista y cols., 2008). Villamarino y su grupo de trabajo en el 2014 observaron que las vacas detectadas como positivas a MAP en el primer parto, producen menos durante toda su vida productiva.

Dado que las características de la leche (e.g. proteínas, grasa, sólidos totales, células somáticas) y la cantidad de litros producidos, pueden depender de la presencia de anticuerpos de MAP, número de lactancia y tercio de lactación, serán analizados teniendo en consideración estas variables.

El objetivo de este capítulo fue analizar los parámetros productivos de tambos comerciales de acuerdo con la presencia de anticuerpos anti MAP en leche.

3.2.- Materiales y métodos

3.2.1.- Origen de las muestras

Las muestras fueron obtenidas de tres establecimientos lecheros que contaban con los datos de control lechero (Producción diaria, Grasa, Proteína, Sólidos totales, Células somáticas, Número de lactación y Tercio de lactación; información facilitada por el Médico Veterinario Marcos Bontá). Las muestras de leche (n=182) fueron tomadas de bovinos de raza Holando Argentino en lactación con 3 a 10 años de edad, sin signos clínicos aparentes compatibles con PTB. Estos rodeos eran manejados en un sistema de pastoreo con suplementación (silo de maíz tipo bolsa), de la provincia de Buenos Aires (Partido de Navarro y Mercedes).

3.2.2.- Toma de muestras

De cada animal (un cuarto mamario anterior y de uno posterior) se tomaron las muestras de leche (50 ml por extracción manual post lavado de la ubre y despunte) en un recipiente estéril.

3.2.3.- Obtención del suero de leche

Cada muestra de leche fue centrifugada a 4°C durante 20 minutos (10.000 rpm), obteniendo tres fracciones: grasa, suero lácteo y sedimento. Se retiró la capa grasa con la espátula de metal y se procedió a absorber el suero de leche con la pipeta de 10 ml. Este suero fue transportado a tubos cónicos de 15 ml, rotulados con el número de muestra y conservados a -20°C hasta su estudio.

El suero lácteo se fraccionó en dos partes. Una de ellas se procesó por electroforesis a fin de evaluar la composición proteica láctea, (Capítulo 4), mientras que la otra fracción fue analizada por la técnica de ELISA-PPA con pre-adsorción, para identificar presencia de anticuerpos específicos anti-MAP.

3.2.4.- ELISA PPA en suero de leche

Se pre-adsorbieron los sueros con *M. phlei* con la finalidad de eliminar la reactividad cruzada (generada por otras micobacterias). Se sensibilizaron microplacas de 96 hoyos (Greiner Microlon, Greiner Bio-One North America Inc., Monroe, NC, USA) durante 16 horas a 4°C con 2 µg de PPA (Allied Monitor Laboratories Inc., Fállete, Missouri, USA) en buffer carbonato/bicarbonato PH 9,6. Luego de cada incubación se realizaron 3 lavados con 100 µL de buffer fosfato salino (PBS) 0,05 % Tween 20 (solución de lavado). Los hoyos fueron incubados con 100 µL de solución de bloqueo (Ovalbúmina al 5%) durante 1 hora a 37°C. Se colocaron 50 µL de los sueros pre-adsorbidos. Luego de 1 hora a 37°C de incubación, se colocaron 50 µL del anti-IgG bovino marcado con peroxidasa (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, MD, USA) diluido 1/5000 y se incubaron nuevamente durante 1 hora a 37°C. El sustrato utilizado fue ortophenilendiamina (OPD, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) en buffer citrato fosfato (Sigma-Aldrich). La reacción se frenó con 50 µL de Ácido Sulfúrico 1 M. Finalmente se realizó la lectura en el espectrofotómetro OpsysMR (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) a 490nm.

El espectrofotómetro mide cuantitativamente la coloración de cada hoyo de la placa de ELISA, estos resultados cuantitativos deben ser analizados para poder realizar el diagnóstico, las muestras estuvieron sembradas por duplicado en el hoyo contiguo. Primeramente se obtuvo el promedio de todas las muestras (2 siembras por muestra). Se tomó el promedio de los hoyos “Blanco” (2 primeros hoyos solo con la lectura de buffer); y esta cantidad fue restada de todos los promedios, (promedio de muestra – Blanco). Estos datos sirvieron para calcular el valor de corte.

El valor de corte (VC) se obtiene del promedio de los controles negativos utilizados (muestras con certeza negativa), sumados a dos desvíos estándares (DE).

Los animales fueron clasificados como positivos si tuvieron densidades ópticas (DO) promedio mayores al VC, y negativos si la DO promedio fue menor al VC.

3.2.5.- Análisis de las muestras de leche por sólidos totales, grasa, proteína, lactosa y conteo de células somáticas

La concentración de grasa, proteína y sólidos totales se obtuvieron del control lechero (Lactoscan - Funke Gerber 3510, Alemania) realizado el mismo día de la toma de muestras, el dato de la lactosa se obtuvo de la diferencia de los sólidos totales con las concentraciones de grasa y proteína.

3.2.6.- Análisis estadístico:

Los resultados fueron analizados por ANVA de acuerdo a un arreglo factorial ($2 \times 3 \times 3$) de Estado de MAP (Positivo, Negativo), número de parto (G1: un parto, G2: dos partos y G3: \geq tres partos) y tercio de lactación (0-100 días = T1, 100-200 días = T2, \geq 200 días = T3).

El análisis se efectuó utilizando la Suma de Cuadrados tipo III, puesto que no todos los grupos (Estado de MAP \times número de parto \times tercio de lactación) tuvieron la misma cantidad de resultados (dos de ellos tuvieron celdas vacías, i.e. positivos de 2da lactancia en primer tercio y segundo tercio de lactación). Las diferencias fueron declaradas significativas siempre que $\alpha \leq 0,05$.

El análisis se realizó evaluando las interacciones triple y doble, pero al no resultar significativas ($p > 0,05$) fueron descartadas del modelo y se analizaron los efectos principales, de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijkl}$$

Dónde:

Y_{ij} : Variable observada en cada muestra

μ : Media poblacional de la variable observada estimada por el promedio.

α_i : Estado de infección positivo o negativo a anticuerpos anti-MAP en suero de leche

β_j : Numero de Parto

γ_k : Tercio de Lactación

ε_{ijkl} : Error experimental.

Los resultados (Rendimiento de leche (l) Rendimiento de grasa, sólidos totales, proteína y lactosa (g) Concentración de grasa, proteína, lactosa y sólidos totales (g dl^{-1}) Número de células somáticas (mil cel. ml^{-1})) se analizaron por estadística descriptiva, calculando las medidas de tendencia central (media y mediana) y de dispersión (desviación estándar). (Anexo II). En todos los casos se verificó con los supuestos de independencia, normalidad y Homocedasticidad.

3.3.- Resultados

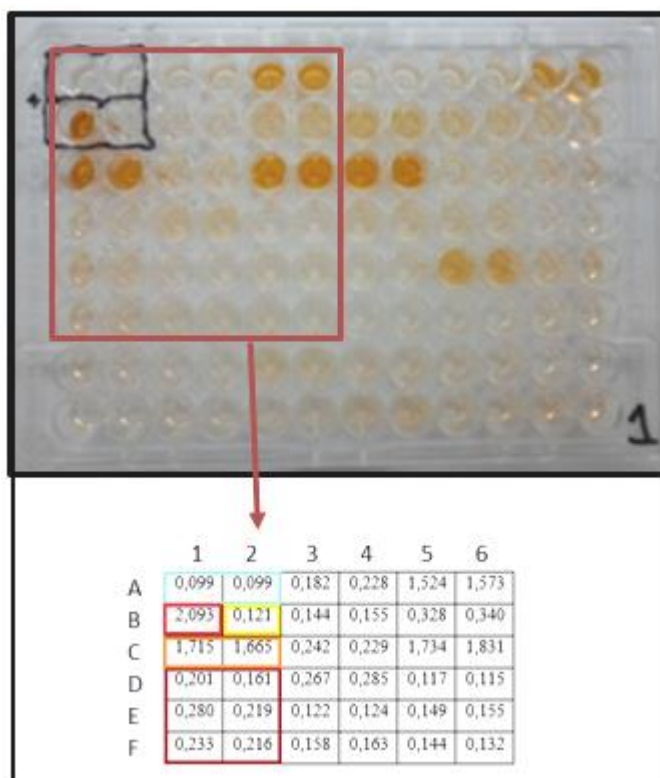


Figura 3.1: Placa representativa del análisis de ELISA-PPA en suero de leche y lectura parcial por espectrofotometría. Donde A1 y A2 son los hoyos blanco, B1 es el control conjugado positivo, B2 es el control conjugado negativo, C1 y C2 son los controles positivos, y D1, D2, E1, E2, F1 y F2 son los controles negativos.

Las muestras de leche positivas muestran una tinción más oscura del análisis de ELISA-PPA en suero de leche, característica que fue medida a través de espectrofotometría (Figura 3.1).

De los 182 animales muestreados, sólo 16 animales resultaron positivos a ELISA-PPA en suero de leche para la determinación de anticuerpos de MAP (Cuadro 8.2.1 del Anexo II), los que representan el 9% de prevalencia; de estos 16 animales, diez de los 16 tenían 3 o más lactaciones (63%). El anexo II, muestra los resultados individuales de las variables dependientes (Litros, Proteína, Grasa, Lactosa, Sólidos Totales, Células Somáticas) e independientes (estado de MAP, Tercio de lactación y Número de lactación), así como los resultados del análisis de estadística descriptiva y las tablas de ANVA.

Los animales MAP negativos presentaron mayores rendimientos de litros, proteína, grasa, lactosa, sólidos totales y células somáticas ($p < 0,05$) y mayor concentración de grasa y sólidos totales (Cuadro 3.1). Por el contrario no se hallaron diferencias ($p > 0,05$) en las concentraciones de proteínas y lactosa.

También se pudo observar que los animales en el primer tercio de lactancia presentaron mayores ($p < 0,05$) rendimientos de litros, proteína, lactosa, sólidos totales y menor concentración de grasa, proteína y sólidos totales (Cuadro 3.1); no registrándose diferencias ($p > 0,05$) en los rendimientos de grasa, células somáticas, ni en las concentraciones de lactosa.

Adicionalmente, se encontró que aquellos animales en la primera lactancia tuvieron menores ($p < 0,05$) valores de células somáticas y mayor concentración de lactosa. No detectándose diferencias ($p > 0,05$) en los rendimientos de litros, grasa, proteína, lactosa, sólidos totales, ni en las concentraciones de grasa, proteína y sólidos totales.

Cuadro 3.1. Rendimiento promedio lácteo diario y concentración g/dl⁻¹ (litros, grasa, proteína, lactosa, sólidos totales) y recuento de células somáticas según estado de MAP, tercio de lactación y número de lactancia.

	RENDIMIENTO								EEM ¹	Signif. ²
	MAP		Tercio de Lactación		Número de lactación					
	Positivo	Negativo	1º	2º	3º	1	2	≥ 3		
Litros (l d ⁻¹)	17,7 ^a	22,0 ^b	23,0 ^a	20,3 ^b	17,6 ^c	19,1 ^a	20,7 ^a	20,9 ^a	0,42	T, M
Grasa (kg d ⁻¹)	647,1 ^a	719,2 ^b	736,3 ^a	672,4 ^a	659,7 ^a	664,0 ^a	706,3 ^a	698,9 ^a	13,35	M
Proteína (kg d ⁻¹)	589,5 ^a	724,3 ^b	735,3 ^a	667,4 ^{a b}	606,0 ^b	635,0 ^a	693,5 ^a	676,9 ^a	12,71	T, M
Lactosa (kg d ⁻¹)	1027,9 ^a	1254,8 ^b	1320,9 ^a	1159,2 ^a	1014,4 ^b	1108,7 ^a	1166,2 ^a	1195,1 ^a	25,08	T, M
Sólidos Totales (kg d ⁻¹)	2264,4 ^a	2698,2 ^b	2791,6 ^a	2499,1 ^{a b}	2280,3 ^b	2407,7 ^a	2566,0 ^a	2570,9 ^a	48,25	T, M
Células Somáticas (× 10 ³ cel. ml ⁻¹)	584,1 ^a	426,8 ^b	496,9 ^a	485,0 ^a	503,3 ^a	301,5 ^a	491,1 ^{a b}	692,7 ^b	38,70	N, M
CONCENTRACIÓN										
Grasa	3,7 ^a	3,3 ^b	3,3 ^a	3,3 ^a	3,8 ^b	3,5 ^a	3,5 ^a	3,5 ^a	0,05	M, T
Proteína	3,3 ^a	3,3 ^a	3,2 ^a	3,3 ^a	3,5 ^b	3,3 ^a	3,4 ^a	3,3 ^a	0,23	T
Lactosa	5,8 ^a	5,7 ^a	5,8 ^a	5,7 ^a	5,7 ^a	5,8 ^a	5,6 ^b	5,7 ^{ab}	0,03	N
Solidos	12,9 ^a	12,4 ^b	12,3 ^a	12,4 ^a	13,0 ^b	12,7 ^a	12,5 ^a	12,5 ^a	0,06	M, T

¹ Error estándar de la media

² Significancia, sólo se indican los factores significativos ($\alpha \leq 0,05$). M: MAP; T: tercio de lactación; N: número de lactancia.

3.4.-Discusión

El objetivo de este capítulo fue analizar la asociación entre los parámetros productivos y la condición de los animales, MAP (Negativo, Positivo).

La prevalencia de Paratuberculosis hallada fue del 9%, resultado que se encuentra dentro de los límites reportados para Argentina específicamente en la Cuenca del Salado (Provincia de Buenos Aires) por Paolicchi y Romano (2007; entre 7% y 20%). Adicionalmente, se verificó que el 63% de los animales MAP positivos fueron provenientes del grupo de 3 o más partos, lo que concuerda con lo reportado por Whitlock y Buergelt (1996) quienes describieron que los animales progresan al estadio de PTB clínica, generalmente entre los 3 - 5 años post infección y manifiestan signos clínicos de diarrea intermitente, pérdida de peso y de producción láctea. Estos autores estiman que por cada caso clínico encontrado puede haber de 15 a 20 animales infectados.

La producción de leche de animales libres de anticuerpos de MAP sobrepasó en un 19% a los litros producidos por los animales positivos a ELISA-PPA en las muestras de leche, Beaudeau y cols., (2007), informó que las vacas ELISA-positivas a MAP, basadas en una sola prueba, tuvieron reducciones en el rendimiento de leche entre 10 – 15 %, resultado similar al de esta investigación, un impacto menor fue hallado por Hendrick y cols., (2005) quien reportó una disminución de un 6% de producción láctea en las vacas positivas (diagnosticadas por ELISA en leche y cultivo bacteriológico).

La producción de leche analizada por número de lactación no fue significativa en esta investigación, dato contrastado por Wood (1967), que sostiene que las mayores producciones fueron alcanzadas en los partos 3, 4 y 5 mientras que el parto 1 obtuvo las menores producciones; de igual modo Cañas y cols., en el 2011, comprobó en su investigación que a medida que aumenta la edad o el número de lactaciones aumenta la producción de leche; ésta diferencia podría estar explicada por que en el grupo de primera lactancia se encuentra casi el 50% de animales, dejando para los otros grupos una menor cantidad de animales, disminuyendo el número de animales de 2 y 3 lactancias.

Comparando la producción de litros de leche en los diferentes tercios de lactación es decir la curva de lactancia, podemos subrayar que a medida que aumenta el periodo de lactación disminuye la producción láctea. Información descrita por Wood (1967).

En esta investigación se obtuvo diferencia estadísticamente significativa para los resultados de rendimiento total de grasa según el estado de anticuerpos de MAP. Observándose una disminución de 10 % del rendimiento total de grasa para los animales positivos a MAP. Hendrick y cols., (2005) publicaron resultados de una menor producción total de grasa para animales positivos a MAP, en concordancia con nuestra investigación. Nuestros resultados muestran un incremento en la concentración de grasa ocasionado probablemente por la disminución del rendimiento de litros, mientras que Nordlund y cols. 1996, Johnson y cols. 2001 y Lombard y cols. 2013 no detectaron diferencias estadísticas significativas en la concentración de grasa en contraste con el grupo de Gonda y cols., (2007) quienes reportaron una disminución en la producción total de grasa y proteína para animales positivos a MAP al igual que Sweeney y cols., (1994) coincidiendo con los datos de rendimiento total en esta investigación.

Cañas y cols., en el 2011, describe que la curva de producción de grasa y proteína siguen una relación inversa a la curva de producción de leche, a medida que

aumenta el número de lactaciones la cantidad de grasa va aumentando, asimismo en esta investigación en la curva de lactancia se observa un incremento del valor de la concentración de grasa en los animales de último tercio de lactación, Cañas también indica que los valores más altos son en los partos 5 y 6, difiriendo con nuestros resultados, donde no se halló diferencia estadística en el número de lactaciones.

Con respecto al momento de la curva de lactancia en el que se toma la muestra se observó una disminución del rendimiento de proteína con respecto a los animales en segundo tercio manteniéndose luego estable en los animales no infectados, de igual manera como lo describieron Cañas y cols., en el 2011. Esta investigación sostiene que la curva alcanza un pico de producción de proteína y luego valores constantes durante toda la lactancia.

Quinn y cols., en el 2006 muestran una gráfica de la concentración de proteína que incrementa sus valores hacia el final de la lactancia, resultados que coinciden a los obtenidos en este trabajo ya que el porcentaje de proteína aumenta en un 5% en los animales de último tercio de lactación.

En este trabajo se observó que la proteína también permanece constante entre los diferentes partos en coincidencia con los resultados encontrados por Cañas y cols., (2011).

El análisis del rendimiento de lactosa con respecto al estado de anticuerpos de MAP, permitió identificar que los animales positivos disminuyeron la producción de lactosa en un 18%. El periodo de lactancia afecta la producción de lactosa ya que se observó una disminución de los animales ubicados en el 3er tercio, estos resultados coinciden con los obtenidos por Cañas y cols., en el 2011; a medida que progresa la lactancia el rendimiento y la concentración de lactosa disminuyen.

Para los resultados de rendimiento de los sólidos totales, analizando la variable estado de anticuerpos de MAP encontramos que en los animales positivos hubo una diferencia de 17% menos que los animales negativos.

Los niveles de lactosa así como los sólidos totales no están descriptos para animales subclínicos ni clínicos con PTB.

El conteo de células somáticas (SC) es considerado un indicador de la calidad de la leche y es usado para estimar el costo económico de la misma. Para los resultados de las células somáticas también observamos diferencia estadística significativa entre los animales positivos y negativos; las muestras positivas a MAP contienen 27 % más cantidad de células somáticas. Taylor y cols., (1981) mostraron una asociación entre altos niveles de SC y la presencia de anticuerpos de MAP lo que puede ser crucial para un efectivo control del ganado lechero. McNab y cols., 1991, mostraron también asociación entre MAP (ELISA positivo) y alto recuento de células somáticas, Nordlund y cols., en 1996 y Hendrick y cols., (2005), no encontraron diferencia significativa entre el recuento de células somáticas y MAP positivas y negativas.

Baptista y cols., (2008), muestra una fuerte asociación entre el alto número de células somáticas y la presencia de anticuerpos de MAP, cerca del 59% de los animales revelaron esta asociación, vacas en un estado de infección de PTB así como vacas con presencia de anticuerpos MAP están asociados con un alto número de SC.

Para el factor número de lactación se observó los animales de segunda lactación tuvieron 48% más cantidad de células somáticas que los animales de primera lactación. De la misma manera los animales de 3 lactaciones a más tuvieron 29% más cantidad de

células somáticas que los animales de dos lactaciones, es decir que a más lactaciones mayor producción de células somáticas.

3.5.- Conclusiones Parciales

Se analizaron los datos productivos de los animales que pudieron ser identificados por la presencia de la respuesta inmune humoral en el suero de la leche. En las hembras en lactación positivas a ELISA-PPA se encontró una reducción en la producción de leche, una disminución en su producción total de Grasa, Proteína, Lactosa y Sólidos totales y un aumento en el recuento de células somáticas.

La presencia de respuesta humoral de *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*, disminuyó significativamente la cantidad de litros producidos, en un 19%, el rendimiento total de proteína, grasa, lactosa y sólidos totales, disminuyó en 18%, 10%, 18%, 17% respectivamente en comparación con los animales negativos. Se concluyó que los factores que generan diferencias son el estado de MAP y el número de lactancia.

El número total de células somáticas, se vio afectado por la presencia de MAP, aumentando en un 27% en comparación con los animales negativos.

En cuanto a la concentración de grasa, respecto al estado de MAP, podemos afirmar que la presencia de anticuerpos de *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* aumentó en 10% la concentración de la grasa en la leche (menor cantidad de litros producidos); respecto a los tercios de lactación podemos afirmar que el último tercio de la curva de lactancia tiene mayor concentración de grasa por la menor cantidad de litros producidos.

Para la concentración de proteína podemos afirmar que los cambios de la misma se debieron al tercio de lactación, mas no a la presencia de anticuerpos de MAP.

Para la concentración de lactosa, podemos afirmar que los cambios de la misma se debieron al número de lactación donde los animales de 3 lactaciones o más poseen 8% más concentración de lactosa.

Para la concentración de sólidos totales, podemos afirmar que los cambios de la misma se debieron al Tercio de lactación y el estado de MAP, en donde la presencia de anticuerpos MAP aumentó la concentración de los sólidos totales en 3.5%, mientras que los animales del tercer tercio tienen una concentración mayor en 5%.

Finalmente viendo los dos análisis, (rendimiento y concentración) podemos concluir que la cantidad de litros se vio modificada por el estado de MAP, la menor producción láctea de los animales positivos resulta en un menor rendimiento de grasa, proteína, lactosa y sólidos totales.

La concentración de proteína y lactosa, no se ve modificada y la concentración de grasa y sólidos totales aumenta en consecuencia de la disminución de los litros de leche en animales positivos a anticuerpos MAP.

El número de células somáticas aumenta en los animales con diagnóstico positivo a anticuerpos MAP, por ELISA-PPA en muestras de leche.

CAPÍTULO 4

ALTERACIONES DEL PERFIL PROTEICO DE LA LECHE Y SU RELACIÓN CON PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN FUNCIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE MAP

4.1.- Introducción

Las proteínas de la leche son sintetizadas principalmente por la glándula mamaria durante la galactopoyesis mediante células secretoras y en menor cantidad por células plasmáticas (Schalm y cols., 1971). Dentro de las fracciones de proteínas sintetizadas por el tejido mamario se encuentran las caseínas que representan el 80% del total, mientras que las proteínas del suero de leche constituyen aproximadamente el 20% (Fonseca y Santos, 2000).

Hasta hace poco, la determinación de las fracciones proteicas de la leche no era considerada una característica importante para el diagnóstico de enfermedades de la glándula mamaria, pero los resultados obtenidos por Sant'Ana (2004) demostraron la importancia de su determinación para el diagnóstico de la mastitis.

La composición de la leche y las fracciones de las proteínas de la leche están influenciadas por muchos factores, entre otros se reconoce que durante la lactancia la concentración más alta de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina se encuentran en el primer tercio, (Jennes, 1970; Pérez y cols., 1990,).

El objetivo de este capítulo fue evaluar las modificaciones de las fracciones proteicas del suero de la leche en función del número de lactancia y de acuerdo a la presencia de anticuerpos a MAP.

4.2.- Materiales y Métodos

4.2.1.- Origen de las muestras

Las muestras fueron obtenidas de tres establecimientos lecheros de la provincia de Buenos Aires (Partidos de Navarro y Mercedes) que contaban con los datos de control lechero (Producción diaria, Grasa, Proteína, Sólidos totales, Células somáticas, Número de lactación y Tercio de lactación; información facilitada por el Médico Veterinario Marcos Bontá). Los animales eran bovinos Holando Argentino en lactación con un rango de edades entre 3 y 10 años.

Los animales fueron diagnosticados sobre muestras individuales de leche en las que se efectuó el análisis de ELISA PPA (ya descrito en el Capítulo 3). Se obtuvieron 16 animales positivos, por lo que a los efectos de comparar, se seleccionaron al azar 16 muestras de animales negativos provenientes del mismo muestreo.

4.2.2.- Acondicionamiento de las muestras

De cada animal se tomaron muestras de leche (50 ml por extracción manual post lavado de la ubre y despunte) en recipiente estéril, tomado de un cuarto mamario anterior y de uno posterior. Las muestras fueron rotuladas y se mantuvieron refrigeradas hasta llegar al laboratorio. Hasta que las muestras fueron procesadas se mantuvieron a -20°C.

4.2.3.- Descripción de las técnicas usadas.

Cada muestra de leche fue centrifugada a 4°C durante 20 minutos (10.000 rpm), y se generó la precipitación de la caseína, por adición de ácido clorhídrico al 10%, a pH 4.6 separando a las proteínas del suero, obteniendo tres fracciones: grasa, suero lácteo y precipitado. Se retiró la capa grasa con la espátula de metal y se procedió a absorber el suero de leche con una pipeta de 100 ml. Este suero fue transportado a los tubos cónicos de 15 ml, rotulados con el número de muestra.

Estas muestras fueron previamente analizadas en el capítulo II, en donde se obtuvieron los resultados del ELISA PPA, se procedió a separar las 16 muestras de resultados positivos, así como también se seleccionó aleatoriamente 16 muestras de

resultado negativo; de estas 32 muestras se obtuvo el valor de la proteína sérica total por refractometría, y electroforesis desarrollados de la misma manera que en el capítulo 2.

4.2.4.- Análisis estadístico:

Los resultados se analizaron por ANVA de acuerdo a un arreglo factorial de Estado de MAP (Positivo, Negativo), Número de parto (G1, G2, $\geq 3 = G3$) y tercio de Lactación (0-100 días = T1; -200 días = T2, ≥ 200 días = T3). Ninguna de las interacciones de segundo y primer orden, resultaron significativas por lo que se analizaron solamente los factores principales. El modelo resultante corresponde al siguiente modelo matemático:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : Variable observada en cada muestra.

μ : Media poblacional de la variable observada estimada por el promedio.

α : Efecto medio poblacional del estado de MAP sobre la variable analizada.

ε_{ij} término de error aleatorio asociado a la observación Y_{ij} .

Los resultados (concentraciones de Igs, α -LA, β -LG, y seroalbúmina) se analizaron por estadística descriptiva, calculando las medidas de tendencia central (media y mediana) y de dispersión (desviación estándar) (Anexo III). En todos los casos se verificó con los supuestos de independencia, normalidad y Homocedasticidad.

Las medias entre tratamientos se declararon diferentes cuando $P \leq 0,05$. Se utilizó el programa Infostat (Versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Las variables respuesta analizadas fueron los niveles de Inmunoglobulinas (Igs), α -lactoalbúmina (α -LA), β -lactoglobulina (β -LG), y seroalbúmina (SA).

4.3.- Resultados

Los animales MAP negativos presentaron mayores ($p < 0,05$) concentraciones séricas en leche de proteínas séricas totales, α -Lactoalbúmina y β -Lactoglobulina e Inmunoglobulinas (Cuadro 4.1), por el contrario no se hallaron diferencias ($p > 0,05$) en las concentraciones de seroalbúmina.

Cuadro 4.1 – Proteínas séricas de la leche en animales MAP positivos y negativos¹

Variable	MAP		EEM ²	Valor P
	Positivo	Negativo		
PS totales	4,4 ^a	6,4 ^b	0.27	0.0001
Inmunoglobulinas	0,5 ^a	0,8 ^b	0.10	0.0245
α -lactoalbúmina	1,6 ^a	2,1 ^b	0.11	0.0005
β -lactoglobulina	2,1 ^a	3,4 ^b	0.13	0.0001
Seroalbúmina	0,3 ^a	0,2 ^a	0.04	0.9004

¹ Los valores medios predichos para número de lactancia y tercio de lactación se encuentran en el cuadro 8.3.4 del Anexo III

² Error estándar de la media

Los resultados de los análisis de estadística descriptiva, los histogramas y los resultados de los análisis de electroforesis y refractometría, así como los datos productivos

correspondientes reportados individualmente y promediado por factor principal se encuentran en el Anexo III.

4.4.- Discusión

El propósito de este capítulo fue analizar las posibles interacciones de los cambios en la composición de las fracciones proteicas con los factores analizados (Estado de MAP, Número de lactación y tercio de lactación).

Un aspecto de importancia es considerar el valor de estas proteínas lácteas como bioindicadores de la presencia de una enfermedad, dado que se ha observado diferencias entre animales positivos y negativos para ciertas patologías.

Los cambios dependen del estado de lactación, por ejemplo en presencia de *Corynebacterium*, la α -Lactoalbúmina disminuye especialmente en la lactación temprana, mientras que la β -lactoglobulina no disminuye a medida que el periodo de lactación progresa. Las infecciones por *Stafilococo* no influyen el contenido de β -lactoglobulina en la leche, la disminución de α -lactoalbúmina observada puede ser explicada por la disminución en la producción de leche al final de la lactación (Caffin y Poutrel, 1985).

Los animales MAP negativos presentaron $6,4 \text{ g l}^{-1}$ de proteína sérica en leche, mientras que los animales MAP positivos mostraron $4,41 \text{ g l}^{-1}$ (i.e. una reducción de 31 %).

Para Swaisgood (1982) la cantidad de proteínas séricas es de 6,6 gr, donde hay un porcentaje importante de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, por lo tanto los animales positivos a MAP se encuentran con un valor menor a los antecedentes de animales negativos y a los controles incluidos en esta investigación.

La composición de estas dos proteínas fue hallada por Ng-Kwai-Hang y Kroeker en 1984, mediante el mismo método usado en este estudio, se encontró que estas dos proteínas correspondían al 15% de la proteína total, coincidiendo al rango detectado en esta investigación, donde estas fracciones principales corresponden al 16,5%. Estos dos autores señalan que a medida que aumenta el número de lactación, la proteína sérica también aumenta, datos que no coinciden con la presente investigación, en donde no se halla diferencia estadística para el número de lactación. Esto podría deberse al reducido número de muestras, puesto que la prevalencia de la PTB es baja, no se pudo realizar a mayor escala.

Se podría afirmar que la presencia de PTB está relacionada con la disminución de litros producidos, además podría estar relacionada con la disminución de la proteína sérica en la leche pero la variación de la proteína sérica, no explica en su totalidad la diferencia en la producción de leche (Gellrich y cols., 2014).

Auldist cols., (1995), señalaron que estas dos proteínas tienen los valores más altos al inicio de la lactación, pero ningún valor fue significativo, en concordancia con esta investigación. Sin embargo, Sant'Ana en el 2004 y Fraga en el 2009 encontraron diferencia estadística entre el primer tercio con el segundo y el tercero por lo que concluye que la proteína sérica decrece a medida que progresa la lactancia.

Los datos promedio de esta investigación para animales negativos a anticuerpos MAP: Inmunoglobulinas ($0,25 \text{ g/l}$), α -LA ($2,03 \text{ g/l}$), β -LG ($3,39 \text{ g/l}$) y seroalbúmina ($0,25 \text{ g/l}$) coinciden con los datos obtenidos por Iturbe (2012) y Fraga (2009).

No hay antecedentes de las fracciones proteicas séricas reportadas para la Paratuberculosis. En esta investigación se observa que los animales positivos para anticuerpos de MAP presentan disminuidos los niveles de Proteína sérica, Inmunoglobulinas, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina en 31%, 35%, 24% y 38% respectivamente.

Este análisis se asemeja al estudio realizado en el capítulo II, donde se encuentran las mismas diferencias estadísticas significativas, salvo para las Inmunoglobulinas, en donde para este análisis los valores fueron más altos, en animales negativos y se encontró DES. Esta diferencia puede deberse al aumento de Igs a causa de enfermedades concomitantes como la mastitis provocando una respuesta inmune, esta característica es propia de tambos de baja calidad sanitaria.

4.5.- Conclusiones Parciales

La presencia de anticuerpos de *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* en las muestras de leche, disminuyó significativamente la concentración de proteínas séricas, α -LA, β -LG e inmunoglobulinas en cambio las concentraciones de seroalbúmina no presentaron diferencia significativas.

La concentración de estas variables no estuvo asociada con el número de lactación, ni con el tercio de lactancia.

Podemos concluir que la presencia de anticuerpos MAP, ocasiona la disminución de la Proteína sérica, Inmunoglobulinas, α -LA, β -LG, lo que podría ser un recurso importante al momento de realizar un diagnóstico como el ELISA en muestras de leche, facilitando así el reconocimiento de los animales positivos subclínicos a Paratuberculosis.

CAPÍTULO 5

IMPACTO ECONÓMICO DE LA PARATUBERCULOSIS BOVINA

5.1.- Introducción:

La paratuberculosis es una enfermedad que impacta en forma importante sobre la producción láctea, debilitando al animal y caracterizada por la pérdida de peso progresiva debido a las diarreas profusas. Esta categorizada como una enfermedad de seria importancia tanto económica como para la salud pública (OIE, 2008). Su distribución es mundial y se considera una enfermedad emergente a pesar de haber sido reconocida desde hace más de un siglo. La PTB es común en el ganado lechero y ha sido relacionada con el sistema de manejo (Radostits *cols.*, 1994). Hasta hoy no existe tratamiento, por lo tanto el control debería fundamentarse en el diagnóstico y en la eliminación de los animales positivos, además de la aplicación de medidas de bioseguridad (Alfaro, 2001).

Las pérdidas económicas directas para esta enfermedad provienen de la muerte del ganado infectado, disminución de la producción de leche, bajas en la producción de terneros y por los incrementos de honorarios profesionales (diagnóstico y medicamentos). Dentro de las pérdidas indirectas se pueden señalar la subutilización de nutrientes, ya que esta enfermedad afecta la absorción, aunque el consumo permanezca normal. También se puede señalar, la pérdida de la condición corporal que se va deteriorando a medida que avanza la patología.

Existen otras pérdidas que no son evidentes y se denominan costos ocultos o inaparentes, como:

- La venta prematura de los animales enfermos clínicos o infectados.
- Reducción en el valor de venta de animales menos productivos e incremento de la tasa de descarte.
- Reducción a la mitad de la expectativa de vida productiva.
- Reducción del stock de reposición, con lo cual se limita la diversidad genética, incremento de los costos de reposición.
- Período improductivo desde el descarte hasta que el animal de reemplazo comienza a producir. Sumado a la subóptima utilización de los salarios, maquinarias y edificios.
- Reducción en la producción láctea en las vacas asintomáticas de hasta un 25 % en la primera lactación.
- Incremento en la susceptibilidad a otras enfermedades y problemas reproductivos.
- Pérdida de inversión en el stock de reposición que ha sido infectado o expuesto desde el nacimiento.

El objetivo de este capítulo fue evaluar el impacto económico de las pérdidas directas asociadas con la MAP sobre la población en estudio.

5.2.- Materiales y Métodos:

Se realizó el análisis de la pérdida económica tomando como población a los 182 animales de los tres rodeos muestreados en la provincia de Buenos Aires (Partido de Mercedes y Navarro).

Se realizaron los siguientes supuestos:

- El ciclo anual de producción láctea se estableció en 305 días.
- El factor de corrección de Litros a Kilos fue de 1,032 g l⁻¹.
- El precio del litro de leche se consideró 2,5 \$ARS.

La evaluación del impacto económico de la enfermedad se realizó calculando la variación en el ingreso bruto asociado con la disminución en producción causada por la enfermedad (reportada en el Capítulo 3). A los efectos del cálculo sólo se tomó en cuenta la variación directa en el rendimiento lechero, *i.e.*

$$\Delta \text{Pesos} = \Delta \eta \times VE$$

En donde:

Δ Pesos (\$): Variación de ingreso

$\Delta \eta$: variación en rendimiento (*i.e.* rendimiento de animales sanos (l. totales) – rendimiento de animales afectados por la enfermedad).

5.3.- Resultados:

En base al cálculo de la variación en el ingreso bruto asociado con la disminución en producción causada por la enfermedad se determinó la pérdida económica de la Paratuberculosis, (Cuadro 8.4.1, Anexo IV), donde se obtuvo la producción anual por vaca negativa a MAP de 6.934 kg; mientras que para la producción anual por vaca positiva a MAP se obtuvo un valor de 5.561 kg.

La pérdida económica solo en cuanto a producción anual de leche para este rodeo de 182 animales ascendería anualmente a 54.894,14 Pesos Argentinos (\$Ar).

5.4.- Discusión

Frecuentemente se discute cual es el valor económico de la incidencia de la PTB en rodeos de producción lechera, debido a la baja frecuencia de casos clínicos, a que las pérdidas en los casos subclínicos no están claramente visibilizadas y fundamentalmente a las dificultades de realizar diagnósticos certeros en los distintos periodos de la enfermedad. En este capítulo se pretendió realizar un ejercicio de análisis económico sobre los resultados obtenidos en los muestreos antes informados.

El análisis económico para esta población (182 animales) permitió estimar una pérdida económica del 20%, solo considerando la disminución en producción de leche ($6.934 - 5.561 = 1373$ kg de leche lactancia⁻¹), lo que representaría unos 92 U\$A por animal lactancia⁻¹ (considerando 8 \$Ar / U\$A).

A pesar que es difícil estimar las pérdidas a nivel individual, en EEUU para el año 2000 se calculó que el impacto de PTB causó un déficit de 1.5 billones de dólares al año, y 100 USD por vaca (OIE 2008), lo que muestra una magnitud similar a la hallada en este estudio.

El costo del análisis de ELISA en leche en el laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias es aproximadamente de 20 pesos por animal. Este proceso se desarrolla con materiales y equipamiento del propio laboratorio, y algunos insumos importados (Antígeno, anticuerpo conjugado y placas de ELISA), protocolo desarrollado en nuestro laboratorio; en comparación con laboratorios extranjeros donde el costo alcanza los 6 U\$D, o 5,25 €.

5.5.- Conclusiones Parciales:

La presencia de anticuerpos de *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* en las muestras de leche, impactó económicamente en esta población al disminuir la cantidad de litros producidos, resultando en un costo económico que para estudio ascendió a 92 U\$A por animal lactancia⁻¹.

Podemos concluir que es importante realizar un diagnóstico de esta enfermedad, para el reconocimiento de los animales positivos subclínicos a Paratuberculosis, a fin de

realizar una estrategia de control sanitario, evitando el contagio de más animales y las pérdidas económicas asociadas.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES FINALES

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el impacto de la infección de MAP sobre la producción de leche a través del estudio individual de vacas lecheras en producción.

El objetivo específico 1, fue tratado en los capítulos 2 y 4, que permitieron demostrar alteraciones del perfil proteico en la leche de rodeos lecheros comerciales con aislamiento de MAP por PCR o con serología positiva. En el presente estudio se atribuye a la presencia de anticuerpos de MAP en las muestras de leche, la disminución de la proteína del suero lácteo, en especial a α -LA y β -LG, pudiendo evidenciar disminuciones del 37 y 52 % respectivamente. A través de estos resultados pudimos validar la hipótesis que afirmaba que “la infección afecta la composición de las fracciones de proteína láctea debido a la menor cantidad de aminoácidos circulantes captados por la glándula mamaria”. Se confirmó además, que “la disminución en las fracciones proteicas no fue homogénea”.

En todos los casos, los valores pertenecientes a las muestras de leche provenientes de vacas no infectadas (controles negativas a MAP) los resultados coincidieron con los reportados por otros autores, lo que convalida los valores de referencia utilizados.

Considerando la ausencia de resultados previos de proteína sérica láctea en animales positivos a MAP, este estudio resultó innovador ya que aportó una descripción del comportamiento de las fracciones de proteínas séricas. Estas alteraciones en los perfiles proteicos de la leche podrían utilizarse como una herramienta de ayuda o un biomarcador para el diagnóstico o pre diagnóstico de la enfermedad.

Además del conocimiento de la composición de proteína sérica podría ser de interés el análisis de las demás fracciones de la proteína así como la caseína, para obtener un perfil completo de la composición láctea. Este trabajo ha contribuido con resultados novedosos sobre la concentración en leche sólidos totales y lactosa, dado que las investigaciones reportadas en la literatura en general sólo informan los contenidos de proteína y grasa, para animales infectados con MAP.

Los objetivos específicos 2 y 3 fueron tratados en el Capítulo 3. Primeramente se demostró la presencia de anticuerpos MAP en muestras de suero de leche, y se asoció la presencia de anticuerpos específicos a MAP en el suero de leche con los diferentes parámetros productivos de calidad de la leche analizados, se obtuvo un porcentaje de positividad del 9% calculando la muestra total como una población. Para los casos subclínicos analizados (positivos a MAP) se identificó el impacto negativo en la producción láctea (disminución de 19%), y en el rendimiento de la grasa, proteína, sólidos totales y lactosa (respectivamente 10%, 18%, 18%, 17%). Además, el número total de células somáticas aumentó en un 27% y la concentración de sólidos totales y grasas aumentaron (10% y 4% respectivamente). Estos resultados verificaron la hipótesis de que “los animales positivos a ELISA PPA puedan ser identificados por la presencia de la respuesta inmune humoral en el suero de la leche” y que “La presencia de los anticuerpos específicos se encuentra asociada con la disminución de la producción de leche y el rendimiento de proteína, grasa, lactosa y sólidos totales”.

Existe una ventaja importante en la detección de la enfermedad en el estado subclínico para contribuir al control de la enfermedad, y de este modo disminuir las pérdidas económicas asociadas. Más aún, si ésta prueba diagnóstica se puede realizar con muestras de leche, esto facilitaría la toma de muestra, evitaría punciones y estrés en el animal.

El análisis de los costos directos asociados con la presencia de PTB indicó la importancia económica de la existencia de animales en estado subclínico en rodeos productivos.

El diagnóstico clínico es una herramienta útil y económica a fin de proponer un control sobre esta enfermedad. Un control adecuado podría permitir que el tambo quede libre de PTB evitando las pérdidas económicas que conduce esta enfermedad. Lo que debería llevar en un futuro a investigaciones abocadas a la producción de vacunas, y a un estricto control del tambo basado en el diagnóstico.

CAPÍTULO 7

LISTA BIBLIOGRÁFICA

- ABD, E.S., SAFINAZ, E.S., Y AIDA, S. (2009). Factors affecting the functional properties of whey protein products a review. *Food Rev Internat*, 25(3), 251-270. Recuperado de https://cdn.shopify.com/s/files/1/0152/2477/files/Whey_Protein_3.pdf
- ALAIS, CH. (1985). Principios de técnica lechera. *Ciencia de la leche* (pp. 873) Barcelona: Reverté. Recuperado de https://books.google.com.ar/books/about/Ciencia_de_la_leche.html?id=bW_ULacGBZMC
- ALFARO, C. (2001). Bioseguridad como componente de los programas sanitarios para minimizar el riesgo de TBC y PTBC en las explotaciones ganaderas. *Boletín Agropecuario, Fundación INLACA*, 3(11), 31-34.
- ALY, S., ANDERSON, R., ADASKA, J., Y JIANG, J., GARDNER, I. (2010). Association between Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection and milk production in two California dairies. *Journal Dairy Science*, 3, 1030-1040. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(10\)00070-6/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(10)00070-6/pdf)
- ANDERSON, M., Y ANDREWS, A. (1977). Progressive changes in individual milk protein concentrations associated with high somatic cell counts. *Journal Dairy Res*, (44), 223. Recuperado de <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=5154084#>
- AULDIST, M.J., COATS, S., ROGERS, G.L., Y MC DOWELL, G.H. (1985). Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, (35), 427-436.
- AYELE, W., BARTOS, M., Y SVASTOVA, P., PAVLIK, I. (2001). Transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Veterinarian Medicine Czech*, 46(7-8), 205-224. Recuperado de <http://agriculturejournals.cz/publicFiles/141424.pdf>
- BACKES, A., SANCHEZ, B., Y GONCALVES, F., VELHO, J.P. (2000). Determinação das frações de proteína e carboidratos de alguns alimentos conforme método de CNCPS. *Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia*, 913-915.
- BADI, F.A., AL HAROON, A., ALLUWAIMI. A. (2010). The gamma delta cells as marker of non-seroconverted cattle naturally infected with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 88(1), 72-76. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528809001519>
- BAPTISTA, F. M., NIELSEN, S.S., Y TOFT, N. (2008). Association between the presence of antibodies to Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, 91(1), 18-109. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096931>.
- BARO, T., JIMÉNEZ. J., MARTÍNEZ, A., Y BOUZA. (2001). *Ubre de una vaca lechera, péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales*. Universidad de Granada, España.

- BATH, D. L., DICKINSON, F., TUCKER, H., Y APLLEMAN, R. (1979). *Dairy cattle principles, practices, problems, profits*. Philadelphia, USA.
- BAWDEN, W. S. Y NICHOLAS, K. R. (1999). *Molecular Genetics of Milk Production*. (539-564 p). The genetics of Cattle. CAB international.
- BEAUDEAU, F., BELLIARD, M., JOLY, A., Y SEEGER H. (2007). Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) infection in dairy cows. *Vet Res*, 38(4), 625-634. Recuperado de <http://publications.edpsciences.org/10.1051/vetres:2007021>
- BEGARA-MCGORUM, I., WILDBLOOD, L.A., CLARKE, C.J., CONNOR, K.M., STEVENSON, K., MCINNES, C.J., SHARP, J.M., Y JONES, D.G. (1998). Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis. *Vet. Immunol.Immunopathol.* 63, 265-287. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016524279800107X>
- BENEDICTUS, G., DIJKHUIZEN, A., Y STELWAGEN, J. (1987). Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* (121), 142-146. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3660545>.
- BENITO, A., Y RIVERA, H. (1999). Seroprevalencia del *Mycobacterium paratuberculosis* en bovinos lecheros del valle de lima. *Rev. Investigaciones Vet del Perú.* (10) 2-23. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172011000400014&script=sci_arttext
- BERGER, S., HINZ, D., BANNANTINE, J., Y GRIFFIN, J. (2006). Isolation of high-affinity single-chain antibodies against *mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis Surface proteins from Sheep with Johne disease. *Clinical and vaccine immunology*, 13, 1022-1029. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1563570/pdf/0163-06.pdf>
- BERGEY, D.H., HARRISON, F.C., BREED, R. S., HAMMER, B.W., HUNTOON, F. M. 1923. Bergey's manual of determinative bacteriology. p. 374-375. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- BIHRMANN, K., NIELSEN, S. S., TOFT, N., Y ERSBOLL, A. K. (2011). Spatial differences in occurrence of paratuberculosis in Danish dairy herds and in control programme participation. *Prev Vet Med.* 103(2-3), 112. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877584515000386>
- BLOOD, D., Y RADOSTITS, O. (1989). Veterinary Medicine, *Paratuberculosis: Johne's disease* (pp. 722.). Londres: Baillière y Tindall.
- BORTREE, A.L., CARROLL, E., Y SCHALM, O. (1962). Whey protein pattern of milk from cows with experimentally produced mastitis. *Journal of Dairy Science.* (45)1465. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203026289657X>
- BRADLEY, A., Y GREEN, M. (2005). Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. *In practice.* (27), 310-315. Recuperado de <http://inpractice.bmj.com/content/27/6/310.full.pdf+html>
- BUERGELT, C.D., Y DUNCAN, J.R. (1978). Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 173(5), 478-480. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/711590>

- BUERGELT, C.D., Y WILLIAMS, J.E. (2004). Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* 82(8), 497-503. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-0813.2004.tb11169.x/full>
- CAFFIN, J.P., Y POUTREL, B. (1985). Physiological and Pathological Factors Influencing Bovine α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin Concentrations in Milk. Nouzilly, France : Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Station de Pathologie de la Reproduction.
- CANO, S. (2009). *Seroprevalencia del Mycobacterium avium spp. paratuberculosis en 3 establos lecheros de Lima, con antecedentes de casos compatibles con paratuberculosis*. (Tesis de Maestría) Universidad Agraria de la Molina, Lima, Perú.
- CAÑAS, J., CERÓN, M., Y CORRALES, J. (2011). Modelación de curvas de lactancia para producción de leche, grasa y proteína en bovinos Holstein en Antioquia, Colombia. *Revista Mvz Córdoba*. 16(2). Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/mvz/v16n2/v16n2a09.pdf>
- CARAVACA, F., GUZMAN, J.J., DELGADO, M., GUERRERO, Y., ALCALDE, M.J., Y GONZALES, P. (2005). Bases de la producción animal, *Manual Universitario*, Universidad de Sevilla, (61).
- CASADO, P., Y GARCÍA, J.A. (1985). La calidad de la leche y los factores que la influyen. *Industrias Lácteas Españolas*, (81), 298.
- CHACON, O., Y BARLETTA, R.G. (2010). Molecular Genetics of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Paratuberculosis. Organism, Disease, Control*, MA: Behr.
- CHANETON, L., TIRANTE, L., MAITO, J., CHAVES, J., Y BUSSMANN, L.E. (2008). Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 91(5), 1865-1873. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(08\)71223-2/fulltext](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(08)71223-2/fulltext)
- CHIODINI, R.J. (1996). Immunology: resistance to paratuberculosis. *Vet.Clin.North Am.Food Anim.Pract*, 12(2), 313-343. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8828108>
- CHIODINI, R.J., VAN KRUININGEN, H.J., Y MERKAL, R. S. (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Vet.*, 74, 218-262. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6375961>
- CIRONE, K., MORSELLA, C., ROMANO, M., Y PAOLICCHI, F.A. (2007). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in food and its relationship with Crohn's disease. *Rev Argent Microbiol.* 39(1), 57-68. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17585661>
- CHILLIARD, Y., FERLAY, A., LOOR, J., ROUEL, J., Y MARTIN, B. (2002). Trans and conjugated fatty acids in milk from cows and goats consuming pasture or receiving vegetable oils or seeds. *Italian Journal of Animal Science*. 1: 243-254. Recuperado de <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4081/ijas.2002.243>

- COLLINS, D.M., GABRIC, D.M., Y LISLE, G.W. (1989). Identification of a repetitive sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60,175-178. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03440.x/pdf>
- COLLINS, M. T. (2010). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and Antimicrobial Agents. *Paratuberculosis: organism, disease, control*. MA: Behr.
- CONRADO, L., VEREDAS, V., NÓBREGA, E., Y SANTANA, C. (2005). Concentration of Alpha- lactalbumin from cow milk whey through expanded bed adsorption using a hydrophobic resin. *Braz. J. Chem. Eng.* 22(4). Recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322005000400002
- COREA, E., ALVARADO, J., VLADIMIR, L., Y BARRIENTOS, L. (2008). Efecto del cambio en la condición corporal, raza y número de partos en el desempeño reproductivo de vacas lecheras. *Rev. Agronomía mesoamericana*, 19(2), 251-259. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/437/43711425010.pdf>
- CORPA, J.M., GARRIDO, J.M., GARCÍA MARÍN, J.F., Y PÉREZ, V. (2000). Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J.Comp.Pathol.* 122(4), 255-265. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997599903687>
- COUSSENS, P.M. (2004). Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infect.Immun.*, 72(6), 3089-3096. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC415675/pdf/1560-03.pdf>
- CROHN, B., GINZBURG, K., Y OPPENHEIMER, G. (1932). Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *J. Am. Med. Assoc.*, 99, 1323-1328. Recuperado de [http://www.amjmed.com/article/0002-9343\(52\)90025-9/pdf](http://www.amjmed.com/article/0002-9343(52)90025-9/pdf)
- DALZIEL, T. (1932). Chronic intestinal enteritis. *Brit. Med.J.*, 2, 1068-1070.
- DI RIENZO, J.A., CASANOVES, F., BALZARINI, M.G., GONZALEZ, L., TABLADA, M., Y ROBLEDO, C.W. (2014). InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- DUKES, H. (1977). *Fisiología de los animales domesticos*. New York, USA: Cornell University.
- FERNÁNDEZ, B., GILARDONI, L.R., JOLLY, A., COLAVECCHIA, S.B., PAOLICCHI, F.A., Y MUNDO S.L. (2012). Detection of Bovine IgG Isotypes in a PPA-ELISA for Johne's Disease Diagnosis in Infected Herds. *Veterinary Medicine International*, 2042-2048. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3390138/pdf/VMI2012-145318.pdf>
- FONSECA, F.L., Y SANTOS, M.V. (2000). *Qualidade do leite e controle da mastite*, (pp 175). São Paulo: Lemos.
- FRAGA, R., RAIMONDO, S. (2009). *Proteinograma de la secreción láctea de cabras*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Sao Paulo, Brasil.
- GELLRICH, H., MEYER, H., Y WIEDEMANN, S. (2014). Composition of major proteins in cow milk differing in mean protein concentration during the first 155 days of lactation and the influence of season as well as shortterm restricted

- feeding in early and mid-lactation. *Animal Science*, 59(3), 97–106. Recuperado de <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/116521.pdf>
- GILARDONI, L.R., FERNÁNDEZ, B., MORSELLA, C., MENDEZB, L., JAR, A.M., PAOLICCHI, F.A., Y MUNDO, S.L. 2016. Mycobacterium paratuberculosis detection in cow's milk in Argentina by immunomagnetic separation-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, (506-512). Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v47n2/1517-8382-bjm-47-02-0506.pdf>
- GONDA, M.G., CHANG, Y.M., SHOOK, G.E., COLLINS, M.T., Y KIRKPATRICK, B.W. (2007). Effect of Mycobacterium paratuberculosis infection on production, reproduction, and health traits in US Holsteins. *Prev Vet Med.*, 16(2-3), 103-119. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587707000232>
- GRANT, I.R., BALL, H.J., ROWE, Y M.T. (2002). Incidence of Mycobacterium paratuberculosis in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol.*, 68(5), 2428-2435. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC127574/pdf/1858.pdf>
- GRASSELLI M.; DEL CAÑIZO A.; FERNÁNDEZ H.; MIRANDA M.; CAMPERI S., Y CASCONO O. (1997). ¿Qué hacer con el suero del queso?. *Ciencia Hoy*, (8), 43.
- GREEN, E., TIZARD, M., MOSS, M., THOMPSON, J., WINTERBOURNE, D., MCFADDEN, J., Y HERMONTAYLOR, J. (1989). Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.*, (17), 9063-9073. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC335114/pdf/nar00139-0159.pdf>.
- HARMON, R.J., SCHANBACHER, F.L., FERGUSON, L.C., Y SMITH, K.L. (1975). Concentration in lactoferrin in milk normal lactating cows and changes occurring during mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, (36)1001. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1096690>
- HARRIS, N.B., Y BARLETTA, R.G. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14(3), 489-512. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88986/pdf/cm000489.pdf>
- HENDRICK, S., KELTON, D.F., LESLIE, K.E., LISSEMORE, K.D., ARCHAMBAULT, M., Y DUFFIELD, T.F. (2005). Effect of *paratuberculosis* on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc.*, 227, 1302-1308. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1288419/pdf/cvj46pg1126.pdf>
- HERNÁNDEZ, M., VALENCIA, E., SEGURA, J. (2002). Duración de la lactancia y producción de leche de vacas Holstein en el Estado de Yucatán, México. *Rev Biomed.*, 13, 25-31. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2002/bio021d.pdf>
- HERMIDA, A., LOPEZ, P., PASIRO, P., RODRIGUES, J., Y SINAL, J. (1992). Fracciones proteicas de la leche. *Anales de Bromatología*, Galicia: Universidad de Santiago de Compostela.

- HESS, H.D., FLOREZ, H., LASCANO, C.E., BAQUERO, L.A., BECERRA, A., Y RAMOS, J. (1999). Fuentes de variación en la composición de la leche y niveles de urea en sangre y leche en vacas en sistemas de doble propósito en el trópico bajo de Colombia. *Pasturas Tropicales*, 21(1), 33-42. Recuperado de http://ciat-library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/Vol21_hess.pdf
- HILL, R.L., Y BREW, K. (1975). Lactose synthetase. *Adv. enzymol. relat. areas mol. Biol.*, 43, 411-490.
- HIRAOKA, Y., SEGAWA, T., KUWAJIMA, K., SUGAI, S., Y MURAI, N. (1980). α -Lactalbumin: A calcium metalloprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 1098–1104. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X80915855>
- HOGARTH, C.J., FITZPATRICK, J.L., NOLAN, A.M., YOUNG, F.J., PITT, A., Y ECKERSALL, P.D. (2004). Differential protein composition of bovine whey: a comparison of whey from healthy animals and from those with clinical mastitis. *Proteomics*, 4, 2094. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200300723/pdf>
- HOLZMANN, C.B., JORGE, M.C., TRAVERSA, M.J., SCHETTINO, D.M., MEDINA, L., Y BERNARDELLI, A. (2004). A study of the epidemiological behaviour of bovine paratuberculosis using time series in Tandil in the province of Buenos Aires, Argentina. *Rev Sci Tech.*, 23(3), 791-799. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15861874>
- ITURBE, F. (2012). Análisis de productos lácteos. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- JAKOBSEN, M.B., ALBAN, L., Y NIELSEN, S.S. (2000). A cross sectional study of paratuberculosis in 1155 Danish dairy cows. *Prev.Vet.Med.*, 46,15-27. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587700001380>
- JENNESS, R. (1970). Protein composition of milk. Milk proteins: chemistry and molecular biology. New York, USA: Academic Press,.
- JOHNSON, Y.J., KANEENE, J.B., GARDINER, J.C., LLOYD, J.W., SPRECHER, D.J., Y COE, P.H. (2001). The effect of subclinical Mycobacterium paratuberculosis infection on milk production in Michigan dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84(10), 2188-2194. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(01\)74665-6/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(01)74665-6/pdf).
- JOHNSON-IFEARULUNDU, J., Y KANEENE, J.B. (1997). Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. *JAVMA*, 110(12), 1735-1739.
- JORGENSEN, J.B. (1977). Survival of Mycobacterium paratuberculosis in slurry. *Nord.Vet.Med.*, 29, 267-270. Recuperado de <http://europepmc.org/abstract/med/331238>
- JUBB, T.F., SERGEANT, E.S., CALLINAN, A.P., Y GALVIN, J. (2004). Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Aust. Vet. J.*, 82(9), 569–573. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-0813.2004.tb11206.x/epdf>
- JUSTE, R.A., ALONSO-HEARN, M., MOLINA, E., GEIJO, M., VAZQUEZ, P., SEVILLA, I.A., Y GARRIDO, J.M. (2009). Significant reduction in bacterial

- shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial. *BMC Research Notes*, 2, 233. Recuperado de <http://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-2-233>.
- KAZDA, J. (2009). The chronology of Mycobacteria and the development of Mycobacterial ecology. Chap. 1. The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health: Springer. Recuperado de https://books.google.com.ar/books?id=d_xinfzC9o0C
- KENNEDY, D.J., Y BENEDICTUS, G. (2001). Control of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in agricultural species. *Rev Sci Tech.*, 20(1), 151-179. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11288510>.
- KHARE, S., FICHT, T.A., SANTOS, R. L., ROMANO, J., FICHT, A.R., ZHANG, S., GRANT, I.R., LIBAL, M., HUNTER, D., Y ADAMS, L.G. (2004). Rapid and sensitive detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *J Clin Microbiol.*, 42(3), 1075-1081. Recuperado de <http://jcm.asm.org/content/42/3/1075.long>.
- KIDDY, C.A., GROVES, M.L., MCCANN, R.E., Y TREECE, J.M. (1968). Effect of udder inflammation on electrophoresis pattern of cow's milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 51, 954.
- KNIGHT, C.H., Y WILDE, C.J. (1993). Mammary cell changes during pregnancy and lactation. *Livest. Prod. Sci.*, 35, 3-19.
- KONECNY, P., BROWN, P, Y SCOUTEN, W. (1994). Chromatographic purification of immunoglobulin G from bovine milk whey. *Journal of Chromatography A*, 673, 45-53. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002196739487056X>
- KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; Y SAWYER, L. (2004). Invited review: betalactoglobulin: binding properties, structure and function. *Journal of Dairy Science*, 87, 785-796. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(04\)73222-1/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(04)73222-1/pdf)
- KUEHNEL, M.P., GOETHE, R., HABERMANN, A., MUELLER, E., ROHDE, M., GRIFFITHS, G., Y VALENTIN-WEIGAND, P. (2001). Characterization of the intracellular survival of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria. *Cell Microbiol.*, 3(8), 551-566. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1462-5822.2001.00139.x/full>
- KUHN, N.J., CARRICK, D.T., Y WILDE, C.J. (1980). Lactose synthesis: the possibilities of regulation. *Journal of Dairy Science*, 63(2), 328-336. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(80\)82934-1/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(80)82934-1/pdf)
- LARSEN, A.B., MOON, H.W., Y MERKAL, R.S. (1972). Susceptibility of horses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J.Vet Res.*, 33(11), 2185-2189. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5081479>
- LIN H, C., CHEN W, L., Y MAO S, J.T. (2007). Antioxidant Nature of Bovine Milk β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 90, 547-555. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(07\)71538-2/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(07)71538-2/pdf).

- LIYING, L., BRANDON, L., PLATTNER, A., Y HOSTETTER, M. (2008). Live *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and a Killed-Bacterium Vaccine Induce Distinct Subcutaneous Granulomas, with Unique Cellular and Cytokine Profiles. *Clinical and vaccine immunology*, 15(5), 783–793. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2394839/pdf/0480-07.pdf>.
- LOMBARD, J.E., GARDNER, I.A., JAFARZADEH, S.R., FOSSLER, C.P., HARRIS, B., CAPSEL, R.T., WAGNER, B.A., Y JOHNSON, W.O. (2013). Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in United States dairy herds in 2007. *Preventive Veterinary Medicine*, 108, 234–238. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016758771200267X>
- LOSINGER, W.C. (2005). Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. *J. Dairy Res.*, 72, 425-432. Recuperado de <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=345183&fileId=S0022029905001007>
- LOVELL, R., LEVI, M.L., Y FRANCIS, J. (1944). Studies on the survival of Johne's bacilli. *J.Comp.Pathol.*, 34, 120-129. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0368174244800133>
- LUGTON, I. (1999). Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. *Immunol.Cell Biol.*, 77(4), 364-372. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/12843137_Mucosa-associated_lymphoid_tissues_as_sites_for_uptake_carriage_and_excretion_of_tubercle_bacilli_and_other_pathogenic_mycobacteria
- MAGNANO, G., SCHNEIDER, M., CARRANZA, A., BÉRGAMO, E., HENRIQUEZ, M.B., Y GIRAUDO, J.A. (2002). Evaluación serológica de paratuberculosis en el sudoeste de la provincia de Córdoba. Argentina. *Vet. Arg.*, 190, 741-746.
- MANNING, E.J.B., Y COLLINS, M.T. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, patogénesis and diagnosis., *T. Rev.Sci.Tech.*, 20(1), 133-143. Recuperado de http://www.johnes.org/handouts/files/ManningOIE_review.pdf
- MARCÉ, C., EZANNO, P., SEEGER, H., PFEIFFER, D.U., Y FOURICHON, C. (2011). Within-herd contact structure and transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a persistently infected dairy cattle herd. *Prev Vet Med.*, 100(2), 116-125. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587711000353>
- MCNAB, W.B., MEEK, A.H., DUNCAN, J.R., MARTIN, S.W., Y VAN DREUMEL, A.A. (1991). An epidemiological study of paratuberculosis in dairy cattle in Ontario: study design and prevalence estimates. *Can.J.Vet.Res.*, 55, 246-251. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1263483/pdf/cjvetres00044-0054.pdf>
- MERKAL, R.S., Y LARSEN, A.B. (1973). Clofazimine treatment of cows naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am.J.Vet.Res.*, 34, 27-28.

- MERKAL, R.S., Y CULLOGH, W.G. (1982). A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Curr.Microbiol.*, 7, 333-5.
- MEZA-NIETO, M.A., VALLEJO-CORDOBA, B., GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.F., FÉLIX, L., Y GOYCOOLEA, F.M. (2006). Effect of β -Lactoglobulin A and B Whey Protein Variants on the Rennet-Induced Gelation of Skim Milk Gels in a Model Reconstituted Skim Milk System. *Journal of Dairy Science*, 90, 582–593. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(07\)71541-2/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(07)71541-2/pdf).
- MOMOTANI, E., WHIPPLE, D.L., THIERMANN, A.B., Y CHEVILLE, N.F. (1988). Role of M- cells and macrophagos in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet.Pathol.*, 25, 131-137. Recuperado de <http://vet.sagepub.com/content/25/2/131.long>
- MOREIRA, A., SPATH, E., Y MORSELLA, C. (1994). Seroprevalence of Johne's disease in eleven districts of Buenos Aires, Argentina. Proceedings of the Fourth International Colloquium on Paratuberculosis, Cambridge, Reino Unido.
- NG-KWAI-HANG, K., Y KROEKER, E. (1984). Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 67, 3052–3056. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(84\)81671-9/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(84)81671-9/pdf)
- NIELSEN, S., Y TOFT, N. (2008). Ante Mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and fecal culture techniques. *Vet. Microbiol.* 129, 217-235. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113507006451>
- NIELSEN, S. Y TOFT, N. (2009). A review of prevalence of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet. Med.*, 88, 1-14. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587708001815>
- NORDLUND, K., GOODGER, W., PELLETIER, J., Y COLLINS, M. (1996). Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 208(11), 1872-1876. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8675477>
- OIE (2008). Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres. Recuperado de <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.11-PARATB.pdf>.
- OIE. (2013). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Recuperado de <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2013>
- OLSEN, J.E., JORGENSEN, J.B., Y NANSEN, P. (1985). On the reduction of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine slurry subjected to batch mesophilic or thermophilic anaerobic-digestion. *Agricultural Wastes*, 13(4), 273-280. Recuperado de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19852425726>
- OSTERMAN, S. (2003). Extended calving interval in combination with milking two o three time day. *Prod.,Sci*, 82, 139-149. Recuperado de <http://pub.epsilon.slu.se/191/1/91-576-6426-9.fulltext.pdf>
- PAOLICCHI, F.A., Y ROMANO, M. (2007). PARATUBERCULOSIS. *Microbiología Veterinaria. Intermédica*, 2, 425-431.

- PEREIRA, M.N., Y ARMENTANO, L.E. (2000). Partial replacement of forage with no forage fiber sources in lactating cow diets. II. Digestion and rumen function. *Journal of Dairy Science*, 83, 2876.
- PÉREZ, M.D., Y CALVO, M. (1995). Interaction of beta-lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. *Journal of Dairy Science*, 78(5), 978-988. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(95\)76713-3/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(95)76713-3/pdf)
- PEREZ, M.D., SANCHEZ, L., ARANDA, P., ENA, J.M., ORIA, R., Y CALVO, M. (1990). Synthesis and evolution of concentration of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin from cow and sheep colostrum and milk throughout early lactation. *Cell Mol Biol.*, 36(2), 205-212. Recuperado <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2379234>
- PILLARS, R., BOLTON, M., Y GROOMS, D. (2011). Case-control study: productivity and longevity of dairy cows that tested positive for infection with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* as heifers compared to age-matched controls. *Journal of Dairy Science*, 94, 2825–2831. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(11\)00270-0/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(11)00270-0/pdf)
- PILLARS, R., GROOMS, D.L., WOLF, C.A., Y KANEENE, J.B. (2009). Economic evaluation of Johne's disease control programs implemented on six Michigan dairy farms. *Prev Vet Med.*, 90(34), 223-232.
- POLLOT, G.E. (2000). A biological approach to lactation curve analysis for milk yield. *Journal of Dairy Science*, 83, 2448-2458. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(00\)75136-8/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(00)75136-8/pdf)
- QUINN, N., KILLEN, L., Y BUCKLEY, F. (2006). Modelling fat and protein concentration curves for Irish dairy cows. *Irish J Agr Food Res.*, 45, 13-23. <http://t-stor.teagasc.ie/bitstream/11019/607/1/modelling%20fat.pdf>
- RADOSTITS, M.O., BLOOD, D.C., Y GEAY, C.C. (1994). Diseases Caused by Bacteria Iv, *Veterinary Medicine* (pp. 841-849). Londres: Baillieri Tindall.
- RANDOLPH, H.E., ERWIN, R., Y RICHTER, R. (1969). Influence of mastitis on properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 57, 15. [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(69\)86794-9/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(69)86794-9/pdf)
- REARTE, D. (1992). Alimentación y composición de la leche en los sistemas pastoriles (pp. 94). Buenos Aires: EEA. CERBAS. INTA.
- RUIZ, J. (2010). *Evaluación de la producción y calidad de la leche en vacas holstein de primer parto suplementadas con ensilaje de papa*. (Tesis de Maestría) Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/6663/00780780.pdf?sequence=1>
- SALGADO, M., KRUIZE, J., Y COLLINS, M.T. (2007). Diagnosis of paratuberculosis by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds. *J Vet Diagn Invest.*, 19(1), 99-102. Recuperado de <http://vdi.sagepub.com/content/19/1/99.long>
- SALGADO, R., VERGARA, O., Y SIMANCA, J. (2008). Relaciones entre peso, condición corporal y producción de leche en vacas del sistema doble propósito.

- Rev. MVZ Córdoba, 13(2), 1360-1364. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/693/69311191011.pdf>
- SANT'ANA, V.A.C. (2004). *Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade. 161 f.* (Tesis de Maestría). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. Recuperado de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10136/tde-24072007-090556/pt-br.php>
- SCHALM, O.W., CARROLL, E.J., Y JAIN, N.C. (1971). Bovine mastitis. (pp. 360) Philadelphia: Lea y Febiger.
- SCHANBACHER, F.L., Y LARRY SMITH, K. (1974). Formation and role of unusual whey proteins and enzymes: relation to mammary function. *Journal of Dairy Science*, 58(7), 1048-1062. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(75\)84678-9/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(75)84678-9/pdf)
- SHANKAR, H., SINGH, S.V., SINGH, P.K., SINGH, A.V., SOHAL, J.S., Y GREENSTEIN, R.J. (2009). Presence, characterization, and genotype profiles of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized milk, and milk products in India by culture, PCR, and PCR-REA methods. *Int J Infect Dis.*, 14(2), 121-126. Recuperado de [http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(09\)00188-X/pdf](http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(09)00188-X/pdf)
- SHIN, S.J., Y COLLINS, M.T. (2008). Thiopurine Drugs Azathioprine and 6-Mercaptopurine Inhibit *Mycobacterium paratuberculosis* Growth In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (2), 418-426. Recuperado de <http://aac.asm.org/content/52/2/418.full>
- SINHA, D.P., Y MIKOLAJCIK, M. (1974). Quantitation of selected whey proteins of mastiffs and normal milk by immunodiffusion. *Journal of Dairy Science*, 57, 600. Recuperado de [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(77\)83926-X/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(77)83926-X/pdf)
- SOBERÓN, M.A. (2011). Paratuberculosis en caprinos (Enfermedad de Johne). México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.
- SPANGLER, E., BECH-NIELSEN, S., Y HEIDER, L.E. (1992). Diagnostic performance of two serologic tests and fecal culture for subclinical paratuberculosis, and associations with production. *Prev.Vet.Med.*, 13, 185-195.
- SUNG, N., Y COLLINS, M.T. (1998). Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl.Environ.Microbiol.*, 64(3), 999-1005. Recuperado de <http://aem.asm.org/content/64/3/999.full>
- SVENSSON, M.H., SABHARWAL, A., HAKANSSON, A.K., MOSSBERG, P., LIPNIUNAS, H., LEFFLER, C., SVANBORG, S., Y LINSE, J. (1999). Molecular characterization of alpha-lactalbumin folding variants That induces apoptosis in tumor cells. *Biol. Chem.*, 274, 6388-6396. Recuperado de <http://www.jbc.org/content/274/10/6388.long>
- SWAISGOOD, H.E. (1982). Chemistry of milk protein. Developments in Dairy Chemistry (pp. 1-59). London, UK.: Elsevier Applied Science Publishers.

- SWEENEY, E.W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 12, 305-312. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8828107>
- SWEENEY, R.W., HUTCHINSON, L.J., Y WHITLOCK, R.H. 1994. Efecto de la infección de MAP en la producción de leche. *J Clin Microbiol*, 133-139.
- SWEENEY, R.W., WHITLOCK, R.H., Y ROSENBERGER, A. E. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J Clin Microbiol*, 30(1), 166-171. Recuperado de <http://jcm.asm.org/content/30/1/166.long>
- TAKANASHI, M., NASU, T., MURAKAMI, T., Y YASUDA, M. (2008). Secondary lymphoid areas in calf ileal Peyer's patch. *J Vet Med Sci.*, 70(9), 985-988. Recuperado de http://ci.nii.ac.jp/els/110006946017.pdf?id=ART0008851439&type=pdf&lang=en&host=cinii&order_no=&ppv_type=0&lang_sw=&no=1468211447&cp=
- TAYLOR, A.W. (1945). Ovine paratuberculosis. *J.Comp.Pathol.*, 55, 41-44.
- TAYLOR, T.K., WILKS, C.R., Y MCQUEEN, D.S. (1981). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Vet. Rec.* 109, 532-533.
- TESSEMA, M.Z., KOETS, A.P., RUTTEN, V.P., Y GRUYS, E. (2001). How does *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis resist intracellular degradation? *Vet.Quimis.*, 23(4), 153-162. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11765232>
- THOREL, M., KRICHEVSKY, M., Y LEVY-FREBAULT, V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin dependent micobacteria, emended description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. silvaticum subsp. nov. *Int. J. Sist. Bact.*, 40, 254-260. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2397193>
- TIWARI, A., VANLEEUEWEN, J.A., MCKENNA, S.L., KEEFE, G.P., Y BARKEMA, H.W. (2006). Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can Vet Journal*, 47(9), 874-882. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1555680/pdf/cvj47pg874.pdf>
- TRINCHERO, G., CETICA, P., PINTOS, L., Y CORDOBA, M. (2013). Introducción al metabolismo del animal poligástrico, (pp. 42-58). Buenos Aires: Editorial facultad agronomía de la Universidad de Buenos Aires.
- TRONCOSO, H. (2014). Producción de leche y biosíntesis. Entorno Ganadero. (pp. 44), México: Universidad Autónoma de México.
- VAN LEEUEWEN, J., KEEFE, G., Y TIWARI, A. (2002). Seroprevalence and productivity effects of infection with bovine leukemia virus, *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and *Neospora caninum* in maritime Canadian *Dairy cattle*. *Bovine*, (1), 86-91.
- VANNUFFEL, P., GILOT, P., LIMBOURG, B., NAERHUYZEN, B., DIETERICH, C., COENE, M., MACHTELINCKX, L., Y COCITO, C. (1994). Development of species-specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's

- disease in cattle. *J Clin Microbiol.*, 32(5), 1211-1216. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1524833/pdf/cvj47pg783.pdf>
- VILLARINO, M.A., SCOTT, H.M., Y JORDAM, E.R. (2014). Influencia del tiempo de parición y el tiempo de detección de anticuerpos de MAP con la reducción de la producción y la curva de lactancia en vacas Holstein. (Tesis de Maestría) Departamento de ciencia animal, Texas, Dallas.
- WALSTRA, P., Y JENNE, R. (1987). Química y Física Lactológica. Zaragoza, España: Ed. Acribia.
- WATTIAUX, M., Y ARMENTAÑO, L. (2002). Esenciales lecheras. Composición de la leche y valor nutricional. Wisconsin: Instituto Babcock para la investigación internacional de la industria lechera.
- WEBER, M., VAN ROERMUND, H., VELTHUIS, A., KOEIJER, A., DE JONG, M., Y NIELEN, M. (2006). Milk quality assurance programmes for paratuberculosis: stochastic simulation of within-herd infection dynamics and economics. (pp. 60-73) Madison, Wisconsin, USA: Manning y Nielsen.
- WHAN, L.B., GRANT, I.R., BALL, H.J., SCOTT, R., Y ROWE, M.T. (2001). Bactericidal effect of chlorine on Mycobacterium paratuberculosis in drinking water. *Lett. Appl. Microbiol.*, 33(3), 227-231. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1472-765x.2001.00987.x/full>
- WHITLOCK, R.H., Y BUERGELT, C. (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 12(2), 345-356. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8828109>
- WHITLOCK, R.H., WELLS, S.J., SWEENEY, R.W., Y TIEM, J. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.*, 77, 387-398. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113500003242>
- WILSON, D.J., ROSSITER, C., HAN, H.R., Y SEARS, P.M. (1993). Association of Mycobacterium paratuberculosis infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. *American Journal of Veterinary Research* 54, 1851-1857. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8291762>
- WOLTER, W., Y KLOPPERT, B. (2004). Interpretación de los resultados del conteo celular y de la aplicación de la terapia. Avances en el Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina. (pp.5). Guadalajara, Jalisco, México.
- WOOD, P.D. (1967). Algebraic model of the lactation curve in cattle. *Nature* 216, 164-165. Recuperado de <http://www.nature.com/nature/journal/v216/n5111/pdf/216164a0.pdf>
- ZANETTI, S., MOLICOTTI, P., CANNAS, S., ORTU, S., AHMED, N., Y SECHI, L.A. (2006). "In vitro" activities of antimycobacterial agents against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* linked to Crohn's disease and paratuberculosis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 5, 27. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1705807/pdf/1476-0711-5-27.pdf>

CAPÍTULO 8**APÉNDICES**

8.1. - Anexo I

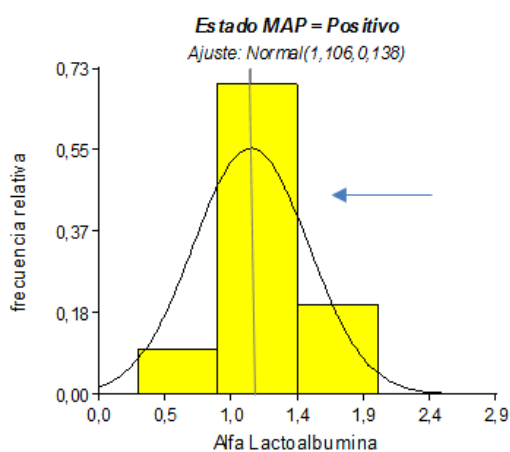
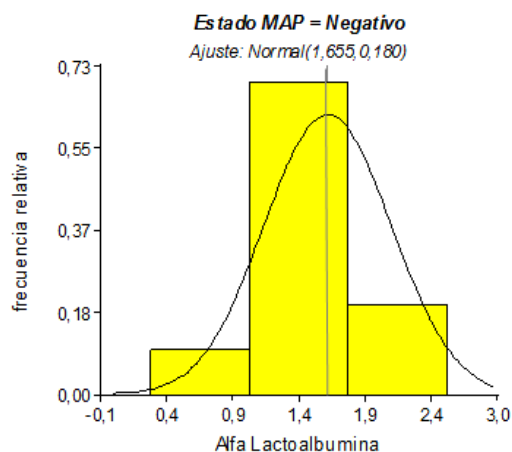
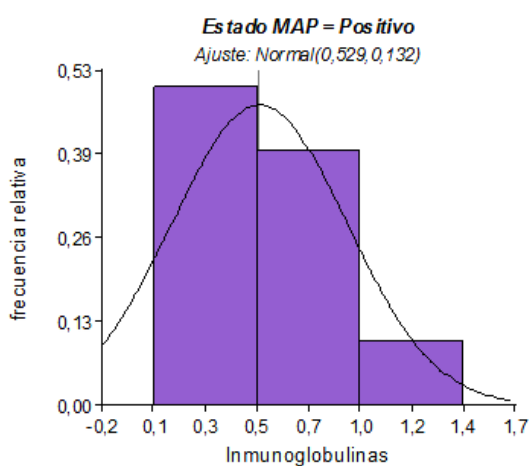
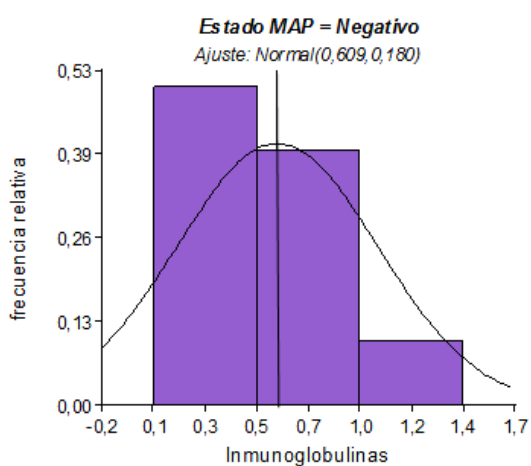
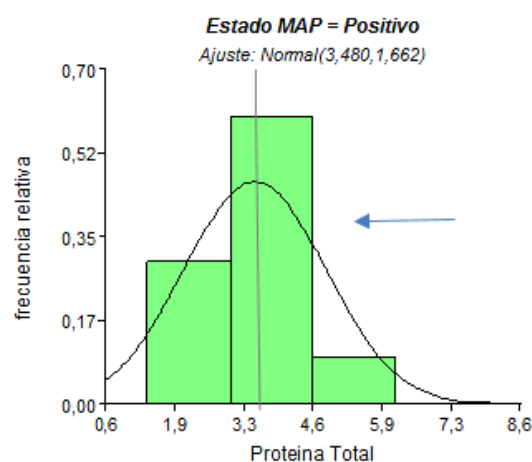
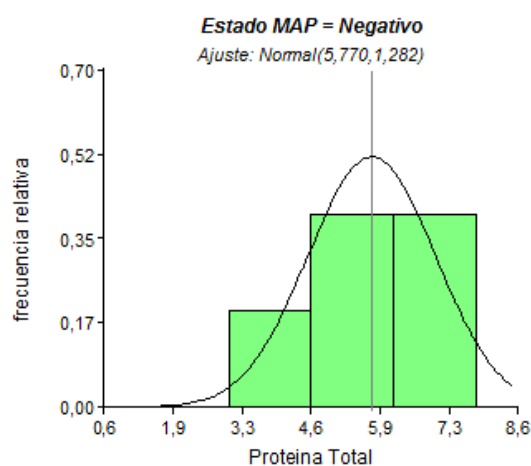
Cuadro 8.1.1. Medición de la Proteína sérica total en el suero de leche expresados en gramo por litro (g l⁻¹) de los animales escogidos de establecimientos libres e infectados de MAP, diagnosticados a través de la prueba de ELISA, Cultivo fecal y PCR

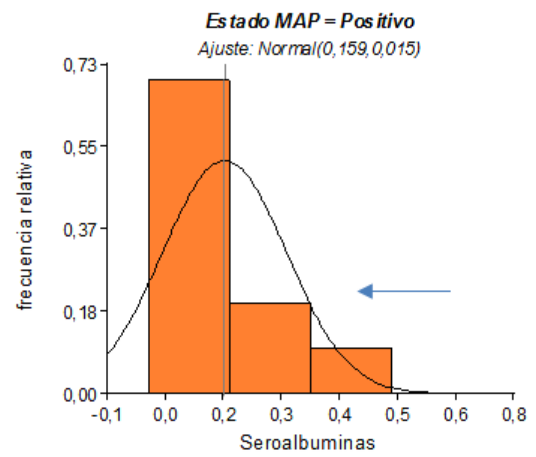
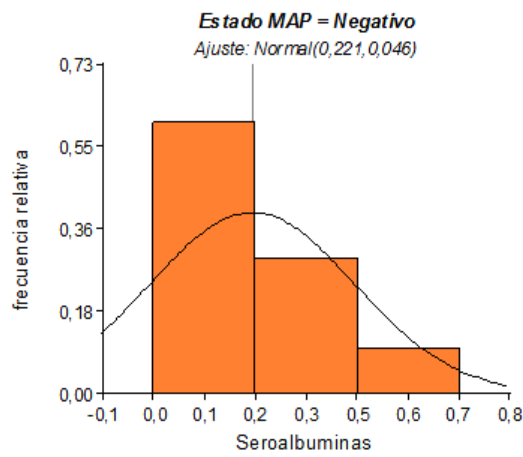
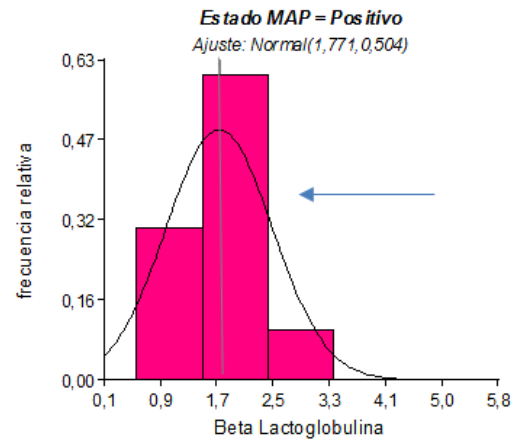
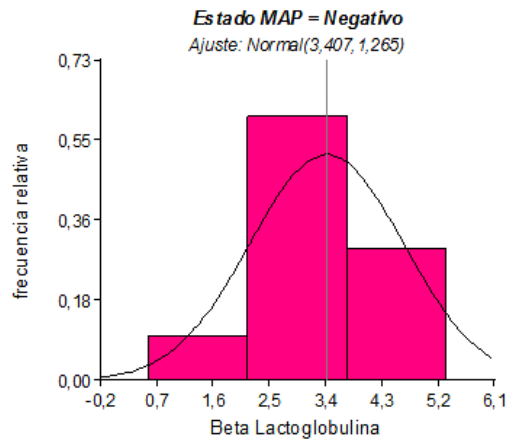
Establecimiento	Número de caravana	ELISA	Cultivo	PCR	Proteína Total
<i>E1</i>	5788	+	+	+	1,6
<i>E1</i>	6084	+	-	+	1,4
<i>E1</i>	6616	+	+	+	3,2
<i>E1</i>	6873	S	+	+	4,0
<i>E2</i>	1784	S	+	+	4,2
<i>E2</i>	1595	+	+	+	4,0
<i>E2</i>	2106	+	+	+	4,0
<i>E2</i>	2185	+	+	+	5,4
<i>E2</i>	2390	+	+	+	2,5
<i>E2</i>	1977	S	+	+	4,5
<i>E3</i>	1	-	-	-	4,4
<i>E3</i>	9	-	-	-	4,8
<i>E3</i>	17	-	-	-	4,5
<i>E3</i>	26	-	-	-	7,8
<i>E3</i>	10	-	-	-	5,3
<i>E4</i>	301	-	-	-	5,2
<i>E4</i>	1744	-	-	-	6,6
<i>E4</i>	1512	-	-	-	5,7
<i>E4</i>	2131	-	-	-	6,6
<i>E4</i>	1913	-	-	-	6,8

Cuadro 8.1.2. Medición individual de Inmunoglobulinas, α -Lactoalbúmina, β -Lactoglobulina y Seroalbúmina en el suero de leche, expresados en gramo por litro (g l⁻¹) de los animales escogidos de establecimientos libres e infectados de MAP

Caravanas Positivas	Caravanas Negativas	Inmunoglobulinas		α -Lactoalbúmina		β -Lactoglobulina		Seroalbúmina	
		Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
5788	1	0,837	0,096	1,63	0,963	2,92	4,072	0,14	0,069
6084	9	0,06	0,74	1,06	2,03	1,06	3,62	0,00	0,4
6616	17	0,28	0,46	0,96	1,29	1,21	2,25	0,06	0,4
6873	26	0,31	0,32	1,13	1,62	2,44	4,86	0,12	0,00
1784	10	0,19	0,25	0,95	1,63	2,14	3,29	0,05	0,13
1595	301	1,09	0,91	1,35	1,57	1,62	5,29	0,13	0,03
2106	1744	0,77	0,16	1,30	1,60	1,63	2,96	0,31	0,07
2185	1512	0,95	0,79	1,47	2,57	1,72	2,63	0,36	0,25
2390	2131	0,58	0,93	0,91	1,74	2,38	1,65	0,13	0,68
1977	1913	0,22	1,43	0,30	1,53	0,59	3,45	0,29	0,18
Promedio		0,53	0,6	1,05	1,60	1,77	3,40	0,16	0,20

Cuadro 8.1.3. Histogramas para la frecuencia relativa de las clases de las proteínas séricas lácteas, Inmunoglobulinas, α -Lactoalbúmina, β -Lactoglobulina y Seroalbúmina expresadas en gramos por litro (g l^{-1}) comparadas por la presencia de anticuerpos MAP





Cuadro 8.1.4. Estadística descriptiva considerando la media, desviación estándar, coeficiente de variación, cuantil 1 y 3 de la proteína sérica, Inmunoglobulinas, α -Lactoalbúmina, β -Lactoglobulina y Seroalbúmina expresados en gramo por litro (g l^{-1}) comparadas por la presencia o ausencia de anticuerpos MAP

	Proteína Sérica		Inmunoglobulinas		α -Lactoalbúmina		β -Lactoglobulina		Seroalbúmina	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Media	3,48	5,77	0,53	0,61	1,05	1,66	1,77	3,41	0,16	0,22
Desviación. Estándar	1,29	1,13	0,36	0,42	0,37	0,42	0,71	1,12	0,12	0,22
Coeficiente de Variación	37,04%	19,63%	68,71%	69,65%	33,57%	25,66%	40,08%	33,02%	75,85%	97,42%
Q1	2,5	4,8	0,22	0,25	0,95	1,53	1,21	2,63	0,06	0,07
Q3	4,2	6,6	0,84	0,91	1,35	1,74	2,38	4,07	0,29	0,40

Salida InfoStat para la Proteína total:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Proteína Total	20	0,50	0,47	26,23

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	26,22	1	26,22	17,81	0,0005
MAP St.	26,22	1	26,22	17,81	0,0005
Error	26,50	18	1,47		
Total	52,72	19			

Salida InfoStat para la Inmunoglobulinas:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Inmunoglobulinas	20	0,01	0,00	69,42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,03	1	0,03	0,20	0,6562
MAP Estado	0,03	1	0,03	0,20	0,6562
Error	2,80	18	0,16		
Total	2,84	19			

Salida InfoStat para la α -Lactoalbúmina

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	Aj	CV
Alfa Lactoalbúmina	20	0,34	0,31	28,90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,51	1	1,51	9,48	0,0065
MAP Estado	1,51	1	1,51	9,48	0,0065
Error	2,86	18	0,16		
Total	4,37	19			

Salida InfoStat para la β -Lactoglobulina:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	Aj	CV
Beta Lacto globulina	20	0,46	0,43	36,33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13,39	1	13,39	15,13	0,0011
MAP Estado	13,39	1	13,39	15,13	0,0011
Error	15,92	18	0,88		
Total	29,31	19			

Salida InfoStat para la seroalbúmina:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Seroalbúmina	20	0,03	0,00	91,83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	1	0,02	0,63	0,4378
MAP Estado	0,02	1	0,02	0,63	0,4378
Error	0,55	18	0,03		
Total	0,57	19			

8.2.- Anexo II

Cuadro 8.2.1. Resultados de las mediciones de la producción de litros de leche del día de la toma de muestras, expresados en litros (L), rendimiento de la grasa total (GT), Proteína total (PT), Lactosa total (LcT), Solidos totales (ST); expresados en gramos totales. Concentración de grasa (G%), Proteína (P%), Lactosa (Lc%), Sólidos (S%), expresados en gramos por decilitro g dl⁻¹ y recuento de células somáticas RCS expresadas en mil. Cel. /ml. en bovinos libres o no de MAP por la prueba ELISA-PPA (Positivos, Negativos) en suero de leche. Ubicación de estos animales en los grupos formados para número de Lactación (G1=1 lactancia, G2=2 lactancias, G3=3 lactancias a más) y por el tercio de lactación (T=1=1 tercio, T=2=2 tercio, T=3=3 tercio)

MAP	L	GT	G %	PT	P %	LcT	Lc %	ST	S %	RCS	N	T
Negativo	23,6	802,40	3,4	743,40	3,15	1347,56	5,71	2893,36	12,26	113	3	2
Negativo	16,2	589,68	3,64	579,96	3,58	1040,04	6,42	2209,68	13,64	1844	2	2
Negativo	23,8	730,66	3,07	759,22	3,19	1399,44	5,88	2889,32	12,14	160	1	2
Negativo	23,8	825,86	3,47	859,18	3,61	1382,78	5,81	3067,82	12,89	54	1	3
Negativo	22,4	815,36	3,64	705,6	3,15	1534,4	6,85	3055,36	13,64	2356	3	3
Negativo	27,2	799,68	2,94	927,52	3,41	1569,44	5,77	3296,64	12,12	187	3	1
Negativo	17	569,50	3,35	532,1	3,13	1030,2	6,06	2131,8	12,54	977	3	2
Negativo	29	814,90	2,81	957	3,3	1606,6	5,54	3378,5	11,65	182	1	3
Negativo	29	1099,1	3,79	968,6	3,34	1664,6	5,74	3732,3	12,87	317	3	2
Negativo	21,2	591,48	2,79	631,76	2,98	1132,08	5,34	2355,32	11,11	544	3	2
Negativo	25,2	808,92	3,21	793,8	3,15	1486,8	5,9	3089,52	12,26	210	1	3
Positivo	25	992,50	3,97	800	3,2	1867,5	7,47	3660	14,64	150	3	1
Negativo	27,4	649,38	2,37	863,1	3,15	1561,8	5,7	3074,28	11,22	235	3	2
Positivo	15,6	781,56	5,01	530,4	3,4	921,96	5,91	2233,92	14,32	208	2	3
Negativo	28	8960	3,2	842,8	3,01	1601,6	5,72	3340,4	11,93	352	3	2

MAP	L	GT	G %	PT	P %	LcT	Lc %	ST	S %	RCS	N	T
Negativo	15,4	751,52	4,88	566,72	3,68	896,28	5,82	2214,52	14,38	180	1	1
Negativo	18,6	764,46	4,11	604,5	3,25	1043,46	5,61	2412,42	12,97	340	3	2
Negativo	22	712,8	3,24	693	3,15	1328,8	6,04	2734,6	12,43	77	1	2
Negativo	15,4	566,72	3,68	498,96	3,24	863,94	5,61	1929,62	12,53	223	3	3
Negativo	29,4	905,52	3,08	961,38	3,27	1567,02	5,33	3433,92	11,68	92	1	2
Negativo	32	841,6	2,63	956,8	2,99	1782,4	5,57	3580,8	11,19	1034	3	1
Positivo	27	850,5	3,15	845,1	3,13	1601,1	5,93	3296,7	12,21	215	3	2
Positivo	20	886	4,43	634	3,17	1134	5,67	2654	13,27	162	1	1
Positivo	16,8	638,4	3,8	577,92	3,44	952,56	5,67	2168,88	12,91	336	3	3
Negativo	16	721,6	4,51	604,8	3,78	878,4	5,49	2204,8	13,78	434	3	3
Positivo	25,8	869,46	3,37	851,4	3,3	1434,48	5,56	3155,34	12,23	1311	3	2
Negativo	21,8	839,3	3,85	767,36	3,52	1166,3	5,35	2772,96	12,72	416	3	2
Negativo	20,6	801,34	3,89	756,02	3,67	1143,3	5,55	2700,66	13,11	1681	1	1
Negativo	17,6	674,08	3,83	563,2	3,2	990,88	5,63	2228,16	12,66	128	1	2
Negativo	25,6	780,8	3,05	806,4	3,15	1418,24	5,54	3005,44	11,74	199	1	2
Negativo	29,6	840,64	2,84	932,4	3,15	1574,72	5,32	3347,76	11,31	122	3	2
Negativo	17,8	708,44	3,98	651,48	3,66	1039,52	5,84	2399,44	13,48	55	1	2
Negativo	22	844,8	3,84	772,2	3,51	1216,6	5,53	2833,6	12,88	281	3	3
Negativo	12,4	504,68	4,07	386,88	3,12	685,72	5,53	1577,28	12,72	313	3	3
Negativo	13,6	501,84	3,69	412,08	3,03	787,44	5,79	1701,36	12,51	59	1	2
Negativo	25,6	1072,6	4,19	855,04	3,34	1413,12	5,52	3340,8	13,05	593	3	3
Positivo	11	451	4,1	401,5	3,65	572	5,2	1424,5	12,95	630	3	2
Negativo	23,2	874,64	3,77	816,64	3,52	1340,96	5,78	3032,24	13,07	116	1	2
Negativo	20	658	3,29	676	3,38	1142	5,71	2476	12,38	87	1	2

MAP	L	GT	G %	PT	P %	LcT	Lc %	ST	S %	RCS	N	T
Negativo	28,4	988,32	3,48	826,44	2,91	1553,48	5,47	3368,24	11,86	173	2	1
Positivo	12,6	395,64	3,14	367,92	2,92	643,86	5,11	1407,42	11,17	1232	3	2
Negativo	26,2	830,54	3,17	841,02	3,21	1498,64	5,72	3170,2	12,1	452	3	2
Positivo	27	688,5	2,55	904,5	3,35	1525,5	5,65	3118,5	11,55	81	1	2
Negativo	22	737	3,35	710,6	3,23	1221	5,55	2668,6	12,13	237	3	2
Negativo	17,4	722,1	4,15	591,6	3,4	976,14	5,61	2289,84	13,16	1209	3	3
Negativo	26	824,2	3,17	837,2	3,22	1474,2	5,67	3135,6	12,06	195	1	2
Negativo	31	889,7	2,87	976,5	3,15	1574,8	5,08	3441	11,1	673	3	2
Negativo	20,6	836,36	4,06	665,38	3,23	1102,1	5,35	2603,84	12,64	91	1	2
Negativo	21,6	635,04	2,94	764,64	3,54	1229,04	5,69	2628,72	12,17	121	1	2
Negativo	19	855	4,5	617,5	3,25	1081,1	5,69	2553,6	13,44	108	1	2
Negativo	25,2	1035,72	4,11	879,48	3,49	1471,68	5,84	3386,88	13,44	87	1	3
Negativo	22,2	683,76	3,08	721,5	3,25	1258,74	5,67	2664	12	336	1	2
Negativo	34,4	1001,04	2,91	1028,56	2,99	1957,36	5,69	3986,96	11,59	100	2	2
Negativo	21	653,1	3,11	661,5	3,15	1224,3	5,83	2538,9	12,09	144	3	3
Positivo	19,8	603,9	3,05	633,6	3,2	1017,72	5,14	2255,22	11,39	1517	3	2
Negativo	17	664,7	3,91	646	3,8	926,5	5,45	2237,2	13,16	977	3	2
Negativo	29	1000,5	3,45	928	3,2	1682	5,8	3610,5	12,45	872	1	2
Negativo	17,6	566,72	3,22	554,4	3,15	950,4	5,4	2071,52	11,77	54	1	2
Negativo	34,2	813,96	2,38	1008,9	2,95	1928,88	5,64	3751,74	10,97	694	3	1
Negativo	27	918	3,4	823,5	3,05	1517,4	5,62	3258,9	12,07	686	3	2
Negativo	24	765,6	3,19	816	3,4	1440	6	3021,6	12,59	221	2	2
Negativo	13,2	489,72	3,71	436,92	3,31	761,64	5,77	1688,28	12,79	462	3	2
Negativo	20	738	3,69	700	3,5	1118	5,59	2556	12,78	290	3	3

MAP	L	GT	G %	PT	P %	LcT	Lc %	ST	S %	RCS	N	T
Negativo	27,6	786,6	2,85	883,2	3,2	1636,68	5,93	3306,48	11,98	275	3	1
Positivo	24,6	880,68	3,58	752,76	3,06	1345,62	5,47	2979,06	12,11	549	3	2
Negativo	11,6	736,6	6,35	432,68	3,73	581,16	5,01	1750,44	15,09	702	3	2
Negativo	16,4	570,72	3,48	547,76	3,34	959,4	5,85	2077,88	12,67	49	1	3
Negativo	22,2	892,44	4,02	825,84	3,72	1303,14	5,87	3021,42	13,61	132	1	3
Negativo	22,2	692,64	3,12	745,92	3,36	1238,76	5,58	2677,32	12,06	89	1	2
Negativo	21,6	524,88	2,43	613,44	2,84	1101,6	5,1	2239,92	10,37	2515	3	2
Negativo	13	288,6	2,22	442	3,4	726,7	5,59	1457,3	11,21	1652	3	2
Negativo	11,2	481,6	4,3	414,4	3,7	580,16	5,18	1476,16	13,18	733	2	3
Negativo	30	1074	3,58	1047	3,49	1734	5,78	3855	12,85	188	3	2
Negativo	30,2	854,66	2,83	884,86	2,93	1754,62	5,81	3494,14	11,57	59	3	2
Negativo	21	735	3,5	726,6	3,46	1253,7	5,97	2715,3	12,93	754	1	1
Negativo	17	775,2	4,56	595	3,5	887,4	5,22	2257,6	13,28	721	2	3
Negativo	20,4	940,44	4,61	714	3,5	1187,28	5,82	2841,72	13,93	354	3	2
Negativo	19,2	935,04	4,87	733,44	3,82	1054,08	5,49	2722,56	14,18	223	2	3
Negativo	25	752,5	3,01	857,5	3,43	1430	5,72	3040	12,16	249	3	2
Negativo	23,8	759,22	3,19	766,36	3,22	1349,46	5,67	2875,04	12,08	221	1	2
Negativo	19,8	613,8	3,1	683,1	3,45	1138,5	5,75	2435,4	12,3	102	1	3
Negativo	15	517,5	3,45	450	3	739,5	4,93	1707	11,38	1661	3	2
Negativo	18,6	582,18	3,13	658,44	3,54	1056,48	5,68	2297,1	12,35	160	2	2
Negativo	22,2	703,74	3,17	699,3	3,15	1411,92	6,36	2814,96	12,68	136	1	2
Negativo	27,4	1175,46	4,29	909,68	3,32	1611,12	5,88	3696,26	13,49	84	3	2
Negativo	11,4	540,36	4,74	436,62	3,83	616,74	5,41	1593,72	13,98	1317	3	2
Negativo	31	1069,5	3,45	1041,6	3,36	2117,3	6,83	4228,4	13,64	293	3	1

MAP	L	GT	G %	PT	P %	LcT	Lc %	ST	S %	RCS	N	T
Negativo	23	687,7	2,99	798,1	3,47	1304,1	5,67	2789,9	12,13	80	1	2
Positivo	15,6	464,88	2,98	519,48	3,33	767,52	4,92	1751,88	11,23	1677	3	1
Negativo	29,4	682,08	2,32	926,1	3,15	1614,06	5,49	3222,24	10,96	323	3	1
Negativo	19,2	848,64	4,42	652,8	3,4	1117,44	5,82	2618,88	13,64	58	1	3
Negativo	27	823,5	3,05	896,4	3,32	1549,8	5,74	3269,7	12,11	72	1	2
Negativo	21,2	750,48	3,54	746,24	3,52	1255,04	5,92	2751,76	12,98	120	1	2
Negativo	19	556,7	2,93	589	3,1	1094,4	5,76	2240,1	11,79	731	1	2
Negativo	24	674,4	2,81	756	3,15	1320	5,5	2750,4	11,46	64	1	2
Negativo	28,8	711,36	2,47	907,2	3,15	1673,28	5,81	3291,84	11,43	74	1	2
Negativo	22	871,2	3,96	693	3,15	1271,6	5,78	2835,8	12,89	335	1	1
Negativo	23,2	716,88	3,09	721,52	3,11	1334	5,75	2772,4	11,95	101	1	2
Negativo	22,4	770,56	3,44	667,52	2,98	1301,44	5,81	2739,52	12,23	52	1	2
Negativo	24	720	3	796,8	3,32	1387,2	5,78	2904	12,1	68	1	3
Negativo	24,2	648,56	2,68	745,36	3,08	1406,02	5,81	2799,94	11,57	64	1	1
Negativo	16,6	511,28	3,08	529,54	3,19	903,04	5,44	1943,86	11,71	933	3	2
Negativo	26,4	784,08	2,97	889,68	3,37	1599,84	6,06	3273,6	12,4	117	3	2
Negativo	21,8	732,48	3,36	747,74	3,43	1172,84	5,38	2653,06	12,17	968	1	3
Positivo	9,8	422,38	4,31	338,1	3,45	624,26	6,37	1384,74	14,13	365	3	1
Negativo	31,2	1045,2	3,35	982,8	3,15	1107,6	3,55	3135,6	10,05	234	1	1
Negativo	19,4	711,98	3,67	719,74	3,71	1096,1	5,65	2527,82	13,03	376	2	2
Negativo	16	564,8	3,53	571,2	3,57	881,6	5,51	2017,6	12,61	260	3	3
Negativo	26	611	2,35	891,8	3,43	1458,6	5,61	2961,4	11,39	253	3	2
Negativo	30	1005	3,35	945	3,15	1512	5,04	3462	11,54	145	3	2
Negativo	19,4	481,12	2,48	595,58	3,07	1098,04	5,66	2174,74	11,21	68	1	2

MAP	L	GT	G %	PT	P %	LcT	Lc %	ST	S %	RCS	N	T
Negativo	31,8	1001,7	3,15	973,08	3,06	1666,32	5,24	3641,1	11,45	99	2	1
Negativo	22,6	720,94	3,19	781,96	3,46	1288,2	5,7	2791,1	12,35	773	2	2
Negativo	9,2	277,84	3,02	331,2	3,6	504,16	5,48	1113,2	12,1	616	3	3
Negativo	24	554,4	2,31	842,4	3,51	1329,6	5,54	2726,4	11,36	239	3	1
Positivo	16,6	581	3,5	675,62	4,07	954,5	5,75	2211,12	13,32	1143	2	3
Negativo	23	676,2	2,94	828	3,6	1336,3	5,81	2840,5	12,35	130	2	2
Negativo	16,2	451,98	2,79	594,54	3,67	801,9	4,95	1848,42	11,41	1823	3	3
Negativo	25	862,5	3,45	787,5	3,15	1462,5	5,85	3112,5	12,45	15	1	2
Negativo	29,2	1007,4	3,45	957,76	3,28	1696,52	5,81	3661,68	12,54	147	1	2
Negativo	23	768,2	3,34	839,5	3,65	1336,3	5,81	2944	12,8	321	1	2
Negativo	16,4	616,64	3,76	565,8	3,45	1038,12	6,33	2220,56	13,54	19	3	1
Negativo	20,8	700,96	3,37	707,2	3,4	1275,04	6,13	2683,2	12,9	2074	1	1
Negativo	18,6	801,66	4,31	652,86	3,51	1032,3	5,55	2486,82	13,37	442	2	3
Negativo	17	538,9	3,17	588,2	3,46	1016,6	5,98	2143,7	12,61	13	1	2
Positivo	11,4	505,02	4,43	393,3	3,45	691,98	6,07	1590,3	13,95	413	1	3
Negativo	27,6	596,16	2,16	855,6	3,1	1592,52	5,77	3044,28	11,03	163	2	1
Negativo	26	611	2,35	808,6	3,11	1622,4	6,24	3042	11,7	81	3	2
Negativo	28,2	640,14	2,27	871,38	3,09	1562,28	5,54	3073,8	10,9	2097	3	1
Negativo	31,8	1001,7	3,15	973,08	3,06	1666,32	5,24	3641,1	11,45	99	2	1
Negativo	13,4	444,88	3,32	412,72	3,08	806,68	6,02	1664,28	12,42	33	1	1
Negativo	13	491,4	3,78	462,8	3,56	741	5,7	1695,2	13,04	164	1	2
Positivo	12,2	420,9	3,45	384,3	3,15	788,12	6,46	1593,32	13,06	518	1	3
Negativo	20,4	599,76	2,94	671,16	3,29	1189,32	5,83	2460,24	12,06	20	1	2
Negativo	27,2	938,4	3,45	856,8	3,15	1591,2	5,85	3386,4	12,45	121	1	1

MAP	L	GT	G %	PT	P %	LcT	Lc %	ST	S %	RCS	N	T
Negativo	20	548	2,74	704	3,52	1178	5,89	2430	12,15	566	1	2
Negativo	14,8	544,64	3,68	510,6	3,45	858,4	5,8	1913,64	12,93	121	1	2
Negativo	26	657,8	2,53	735,8	2,83	1492,4	5,74	2886	11,1	791	3	2
Negativo	24,4	888,16	3,64	768,6	3,15	1671,4	6,85	3328,16	13,64	171	3	2
Negativo	17,8	364,9	2,05	560,7	3,15	989,68	5,56	1915,28	10,76	36	1	2
Negativo	27	772,2	2,86	880,2	3,26	1576,8	5,84	3229,2	11,96	295	2	2
Negativo	19,2	624	3,25	683,52	3,56	1092,48	5,69	2400	12,5	20	1	1
Negativo	13	408,2	3,14	465,4	3,58	768,3	5,91	1641,9	12,63	75	1	2
Negativo	26,6	835,24	3,14	848,54	3,19	1625,26	6,11	3309,04	12,44	121	1	2
Negativo	22	662,2	3,01	693	3,15	1293,6	5,88	2648,8	12,04	55	1	3
Negativo	23	830,3	3,61	680,8	2,96	1373,1	5,97	2884,2	12,54	12	1	1
Negativo	27,2	938,4	3,45	856,8	3,15	1591,2	5,85	3386,4	12,45	121	1	1
Negativo	16,6	585,98	3,53	542,82	3,27	974,42	5,87	2103,22	12,67	67	1	1
Negativo	22,8	686,28	3,01	731,88	3,21	1297,32	5,69	2715,48	11,91	221	1	2
Negativo	19,2	579,84	3,02	622,08	3,24	1163,52	6,06	2365,44	12,32	79	1	2
Negativo	20,8	422,24	2,03	711,36	3,42	1183,52	5,69	2317,12	11,14	75	1	2
Negativo	19,6	652,68	3,33	676,2	3,45	1103,48	5,63	2432,36	12,41	777	1	2
Negativo	7,6	227,24	2,99	270,56	3,56	342	4,5	839,8	11,05	2258	2	2
Negativo	26	624	2,4	800,8	3,08	1466,4	5,64	2891,2	11,12	168	3	2
Negativo	11,6	498,8	4,3	446,6	3,85	664,68	5,73	1610,08	13,88	237	1	2
Negativo	23,6	759,92	3,22	755,2	3,2	1307,44	5,54	2822,56	11,96	85	1	1
Negativo	17,6	668,8	3,8	598,4	3,4	987,36	5,61	2254,56	12,81	846	1	1
Negativo	22	616	2,8	774,4	3,52	1278,2	5,81	2668,6	12,13	82	2	3
Negativo	20,6	628,3	3,05	739,54	3,59	1240,12	6,02	2607,96	12,66	77	1	2

MAP	L	GT	G %	PT	P %	LcT	Lc %	ST	S %	RCS	N	T
Negativo	13,2	407,88	3,09	468,6	3,55	786,72	5,96	1663,2	12,6	137	1	2
Negativo	13,8	434,7	3,15	409,86	2,97	560,28	4,06	1404,84	10,18	144	2	2
Negativo	20,6	473,8	2,3	669,5	3,25	1320,46	6,41	2463,76	11,96	121	1	1
Negativo	14	557,2	3,98	509,6	3,64	788,2	5,63	1855	13,25	152	1	3
Negativo	23	793,5	3,45	706,1	3,07	1363,9	5,93	2863,5	12,45	16	1	1
Negativo	33	858	2,6	966,9	2,93	1943,7	5,89	3768,6	11,42	486	3	1
Negativo	21,2	674,16	3,18	731,4	3,45	1170,24	5,52	2575,8	12,15	2174	3	2
Negativo	20,4	622,2	3,05	660,96	3,24	1248,48	6,12	2531,64	12,41	121	1	3
Negativo	18,6	637,98	3,43	643,56	3,46	1084,38	5,83	2365,92	12,72	416	1	1
Negativo	31,2	914,16	2,93	982,8	3,15	1722,24	5,52	3619,2	11,6	84	2	1
Negativo	13,4	375,2	2,8	422,1	3,15	795,96	5,94	1593,26	11,89	138	1	2
Negativo	25	680	2,72	787,5	3,15	1537,5	6,15	3005	12,02	76	2	3
Negativo	33	858	2,6	966,9	2,93	1943,7	5,89	3768,6	11,42	486	3	1
Negativo	13,4	407,36	3,04	419,42	3,13	802,66	5,99	1629,44	12,16	19	1	2
Negativo	22,2	856,92	3,86	725,94	3,27	1314,24	5,92	2897,1	13,05	121	2	2
Negativo	26	774,8	2,98	845	3,25	1492,4	5,74	3112,2	11,97	995	2	1
Negativo	19	619,4	3,26	592,8	3,12	1103,9	5,81	2316,1	12,19	145	3	1
Negativo	23,6	759,92	3,22	755,2	3,2	1307,44	5,54	2822,56	11,96	85	1	1
Negativo	12,6	391,86	3,11	437,22	3,47	723,24	5,74	1552,32	12,32	368	2	3
Negativo	24,4	631,96	2,59	768,6	3,15	1490,84	6,11	2891,4	11,85	49	1	3
Negativo	13,4	407,36	3,04	419,42	3,13	802,66	5,99	1629,44	12,16	19	1	2
Negativo	20	464	2,32	640	3,2	1168	5,84	2272	11,36	374	3	1
Negativo	21,2	722,92	3,41	756,84	3,57	1265,64	5,97	2745,4	12,95	977	1	2

Cuadro 8.2.2. Estadística descriptiva (media, desviación estándar, coeficiente de variación, cuantil 1 y 3) de la producción de litros de leche del día de la toma de muestras expresados en litros (L), rendimiento de la grasa total (GT), Proteína total (PT), Lactosa total (LcT), Sólidos totales (ST); expresados en gramos totales. Concentración de grasa (G%), Proteína (P%), Lactosa (Lc%), Sólidos (S%), expresados en gramos por decilitro g dl⁻¹ y recuento de células somáticas RCS expresadas en mil. Cel. /ml. en animales libres o no de MAP por la prueba ELISA-PPA (Positivos +, Negativos -) en suero de leche

	Litros		Grasa				Proteína			
	+	-	G% ⁺	GT ⁺	G% ⁻	GT ⁻	P% ⁺	PT ⁺	P% ⁻	PT ⁻
Media	17,7	22,0	3,68	647,1	3,30	719,2	3,33	589,5	3,31	724,3
Desviación Estándar	6,11	5,60	0,16	200,70	0,63	177,93	0,27	191,53	0,23	166,53
Coeficiente de Variación	33,61	25,60	17,90%	30,78%	19,01%	25,12%	8,02%	31,89%	6,82%	23,22%
Q1	12,20	17,80	2,94	451,00	2,94	589,68	3,15	393,30	3,15	598,40
Q3	24,60	26,00	3,64	850,50	3,64	830,30	3,44	752,76	3,49	842,40

	Sólidos totales				Lactosa				Células Somáticas	
	S% ⁺	ST ⁺	S% ⁻	ST ⁻	Lc% ⁺	LcT ⁺	Lc% ⁻	LcT ⁻	+ ⁺	- ⁻
Media	12,88	2264,4	12,35	2698,2	5,77	1027,9	5,70	1254,8	584,1	426,8
Desviación Estándar	1,13	755,71	0,83	633,08	0,63	393,92	0,03	328,67	534,47	516,51
Coeficiente de Variación	8,85%	32,78%	6,73%	23,67%	10,88%	37,42%	6,65%	26,32%	81,39%	132,20%
Q1	11,55	1590,30	11,79	2254,56	5,20	691,98	5,55	1039,52	208,00	87,00
Q3	13,32	2979,06	12,81	3089,52	5,93	1345,62	5,87	1492,40	1143,00	442,00

Salida InfoStat para la Litros producidos:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Litros	182	0,14	0,11	25,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	824,39	5	164,88	5,68	0,0001
MAP Estado	199,62	1	199,62	6,87	0,0095
Ter. Lactancia	505,65	2	252,83	8,71	0,0002
Num Lac	119,11	2	59,56	2,05	0,1317
Error	5110,53	176	29,04		
Total	5934,91	181			

Comparación de medias

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,76804

Error: 29,0371 gl: 176

Map Status	Mediasn	E.E.	
Positivo	17,67 16	1,36	A
Negativo	22,03 166	0,50	B

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,62173

Error: 29,0371 gl: 176

Num Lac	Mediasn	E.E.	
1	19,07 87	0,88	A
2	20,67 26	1,09	A
3	20,81 69	0,84	A

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,52814

Error: 29,0371 gl: 176

Dias Lactancia	Mediasn	E.E.	
3	17,58 38	1,03	A
2	20,31 102	0,72	B
1	22,98 42	0,94	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Salida InfoStat para el rendimiento de grasa:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Grasa	182	0,04	0,01	25,44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	240559,98	5	48112,00	1,50	0,1911
MAP Estado	46139,25	1	46139,25	1,44	0,2315
Ter. Lactancia	142152,20	2	71076,10	2,22	0,1116

Num Lac	52268,53	2	26134,27	0,82	0,4436
Error	5633458,98	176	32008,29		
Total	5874018,95	181			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=84,55927

Error: 27097,6135 gl: 176

MAP Estado	Media.	n	E.E.	
Positivo	589,49	16	41,66	A
Negativo	724,28	166	15,37	B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=77,23066

Error: 27097,6135 gl: 176

Ter. Lactancia	Media.	n	E.E.	
3	606,03	38	31,38	A
2	667,42	102	22,04	A B
1	734,33	42	28,73	B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=80,08975

Error: 27097,6135 gl: 176

Num Lac	Media.	n	E.E.	
1	634,96	87	26,96	A
3	676,89	69	25,63	A
2	693,46	26	33,45	A

Media. con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$)

Salida InfoStat para la concentración de grasa:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Grasa	182	0,09	0,07	18,48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,70	5	1,34	3,53	0,0045
MAP Estado	2,09	1	2,09	5,52	0,0199
Ter. Lactancia	4,52	2	2,26	5,96	0,0031
Num Lac	0,08	2	0,04	0,11	0,8950
Error	66,71	176	0,38		
Total	73,40	181			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,31625

Error: 0,3790 gl: 176

MAP Estado	Media.	n	E.E.	
Negativo	3,34	166	0,06	A
Positivo	3,72	16	0,16	B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,28884

Error: 0,3790 gl: 176

Ter. Lactancia	Media.	n	E.E.	
1	3,32	42	0,11	A
2	3,38	102	0,08	A
3	3,78	38	0,12	B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,29953

Error: 0,3790 gl: 176

Num Lac	Media.	n	E.E.	
3	3,49	69	0,10	A
2	3,52	26	0,13	A
1	3,53	87	0,10	A

Media. con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$)

Salida InfoStat para el rendimiento de proteína:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Proteína	182	0,10	0,08	23,28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	555710,63	5	111142,13	4,10	0,0015
MAP Estado	198554,14	1	198554,14	7,33	0,0075
Ter. Lactancia	278947,32	2	139473,66	5,15	0,0067
Num Lac	78209,16	2	39104,58	1,44	0,2390
Error	4769179,97	176	27097,61		
Total	5324890,60	181			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=84,55927

Error: 27097,6135 gl: 176

MAP Estado	Media.	n	E.E.	
Positivo	589,49	16	41,66	A
Negativo	724,28	166	15,37	B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=77,23066

Error: 27097,6135 gl: 176

Ter. Lactancia	Media.	n	E.E.	
3	606,03	38	31,38	A
2	667,42	102	22,04	A
1	734,33	42	28,73	B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=80,08975

Error: 27097,6135 gl: 176

Num Lac	Media.	n	E.E.	
1	634,96	87	26,96	A
3	676,89	69	25,63	A
2	693,46	26	33,45	A

Media con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$)

Salida InfoStat para la concentración de proteína:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Proteína	182	0,12	0,10	6,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,15	5	0,23	4,86	0,0003
MAP Estado	0,01	1	0,01	0,17	0,6827
Ter. Lactancia	0,95	2	0,48	10,08	0,0001
Num Lac	0,19	2	0,09	1,98	0,1407
Error	8,31	176	0,05		
Total	9,46	181			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11163

Error: 0,0472 gl: 176

MAP Estado	Media.	n	E.E.	
Negativo	3,33	166	0,02	A
Positivo	3,35	16	0,05	A

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10195

Error: 0,0472 gl: 176

Ter. Lactancia	Media.	n	E.E.	
1	3,23	42	0,04	A
2	3,31	102	0,03	A
3	3,45	38	0,04	B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10573

Error: 0,0472 gl: 176

Num Lac	Media.	n	E.E.	
3	3,29	69	0,03	A
1	3,34	87	0,04	A B
2	3,41	26	0,04	B

Media. con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$)

Salida InfoStat para el rendimiento de lactosa:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Lactosa	182	0,12	0,10	26,12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2497173,43	5	499434,69	4,83	0,0004
MAP Estado	562145,06	1	562145,06	5,43	0,0209
Ter. Lactancia	1655330,64	2	827665,32	8,00	0,0005
Num Lac	279697,73	2	139848,86	1,35	0,2616
Error	18216678,74	176	103503,86		
Total	20713852,17	181			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=165,26237

Error: 103503,8565 gl: 176

MAP Estado	Media.	n	E.E.	
Positivo	1027,85	16	81,42	A
Negativo	1254,74	166	30,04	B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=150,93935

Error: 103503,8565 gl: 176

Ter. Lactancia	Media.	n	E.E.	
3	1014,47	38	61,33	A
2	1159,26	102	43,07	A
1	1320,90	42	56,16	B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=156,52714

Error: 103503,8565 gl: 176

Num Lac	Media.	n	E.E.	
1	1108,72	87	52,68	A
2	1166,18	26	65,37	A
3	1195,09	69	50,10	A

Media. con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$)

Salida InfoStat para la concentración de lactosa:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Lactosa	182	0,05	0,02	7,03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,40	5	0,28	1,74	0,1284
MAP Estado	0,07	1	0,07	0,42	0,5185
Ter. Lactancia	0,24	2	0,12	0,74	0,4793
Num Lac	1,09	2	0,55	3,40	0,0357

Error	28,34	176	0,16
Total	29,74	181	

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,20614

Error: 0,1610 gl: 176

MAP Estado	Media.	n	E.E.	
Negativo	5,68	166	0,04	A
Positivo	5,80	16	0,10	A

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18828

Error: 0,1610 gl: 176

Ter. Lactancia	Media.	n	E.E.	
2	5,69	102	0,05	A
3	5,74	38	0,08	A
1	5,78	42	0,07	A

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,19525

Error: 0,1610 gl: 176

Num Lac	Media.	n	E.E.	
2	5,61	26	0,08	A
3	5,72	69	0,06	A B
1	5,84	87	0,07	B

Media. con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$)

Salida InfoStat para el rendimiento de solidos totales:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Sólidos	182	0,10	0,07	23,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7701662,47	5	1540332,49	3,93	0,0021
MAP Estado	1988545,50	1	1988545,50	5,07	0,0255
Ter. Lactancia	4674598,87	2	2337299,43	5,96	0,0031
Num Lac	1038518,10	2	519259,05	1,32	0,2685
Error	68982997,84	176	391948,85		
Total	76684660,31	181			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=321,59583

Error: 391948,8514 gl: 176

MAP Estado	Media.	n	E.E.	
Positivo	2264,42	16	158,45	A
Negativo	2698,23	166	58,45	B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=293,72364

Error: 391948,8514 gl: 176

Ter. Lactancia	Media.	n	E.E.	
3	2280,26	38	119,35	A
2	2499,14	102	83,81	A B

1	2791,55	42	109,28	B
---	---------	----	--------	---

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=304,59733

Error: 391948,8514 gl: 176

Num Lac	Media.	n	E.E.
1	2407,66	87	102,52 A
2	2565,96	26	127,20 A
3	2570,87	69	97,49 A

Media. con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$)

Salida InfoStat para la concentración de solidos totales:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Solidos	182	0,11	0,08	6,71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	14,63	5	2,93	4,26	0,0011
MAP Estado	3,22	1	3,22	4,69	0,0317
Ter. Lactancia	9,77	2	4,89	7,11	0,0011
Num Lac	1,64	2	0,82	1,19	0,3061
Error	120,89	176	0,69		
Total	135,52	181			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,42573

Error: 0,6869 gl: 176

MAP Estado	Media.	n	E.E.
Negativo	12,35	166	0,08 A
Positivo	12,88	16	0,21 B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,38883

Error: 0,6869 gl: 176

Ter. Lactancia	Media.	n	E.E.
1	12,33	42	0,14 A
2	12,37	102	0,11 A
3	12,97	38	0,16 B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,40323

Error: 0,6869 gl: 176

Num Lac	Media.	n	E.E.
3	12,50	69	0,13 A
2	12,54	26	0,17 A
1	12,70	87	0,14 A

Media. con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$)

Salida InfoStat para la cantidad de células somáticas:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Cel som	182	0,14	0,11	118,65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6854468,04	5	1370893,61	5,68	0,0001
MAP Estado	1032483,39	1	1032483,39	4,28	0,0401
Ter. Lactancia	5249,23	2	2624,61	0,01	0,9892
Num Lac	5816735,43	2	2908367,71	12,05	<0,0001
Error	42482375,72	176	241377,13		
Total	49336843,76	181			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=252,37351

Error: 241377,1348 gl: 176

MAP Estado	Media.	n	E.E.
Negativo	426,75	166	45,87 A
Positivo	584,07	16	124,34 A

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=230,50071

Error: 241377,1348 gl: 176

Ter. Lactancia	Media.	n	E.E.
2	484,98	102	65,77 A
1	496,88	42	85,76 A
3	503,33	38	93,66 A

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=239,03388

Error: 241377,1348 gl: 176

Num Lac	Media.	n	E.E.
1	301,51 87	80,45	A
2	491,08 26	99,82	A B
3	692,65 69	76,51	B

Media. con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$)

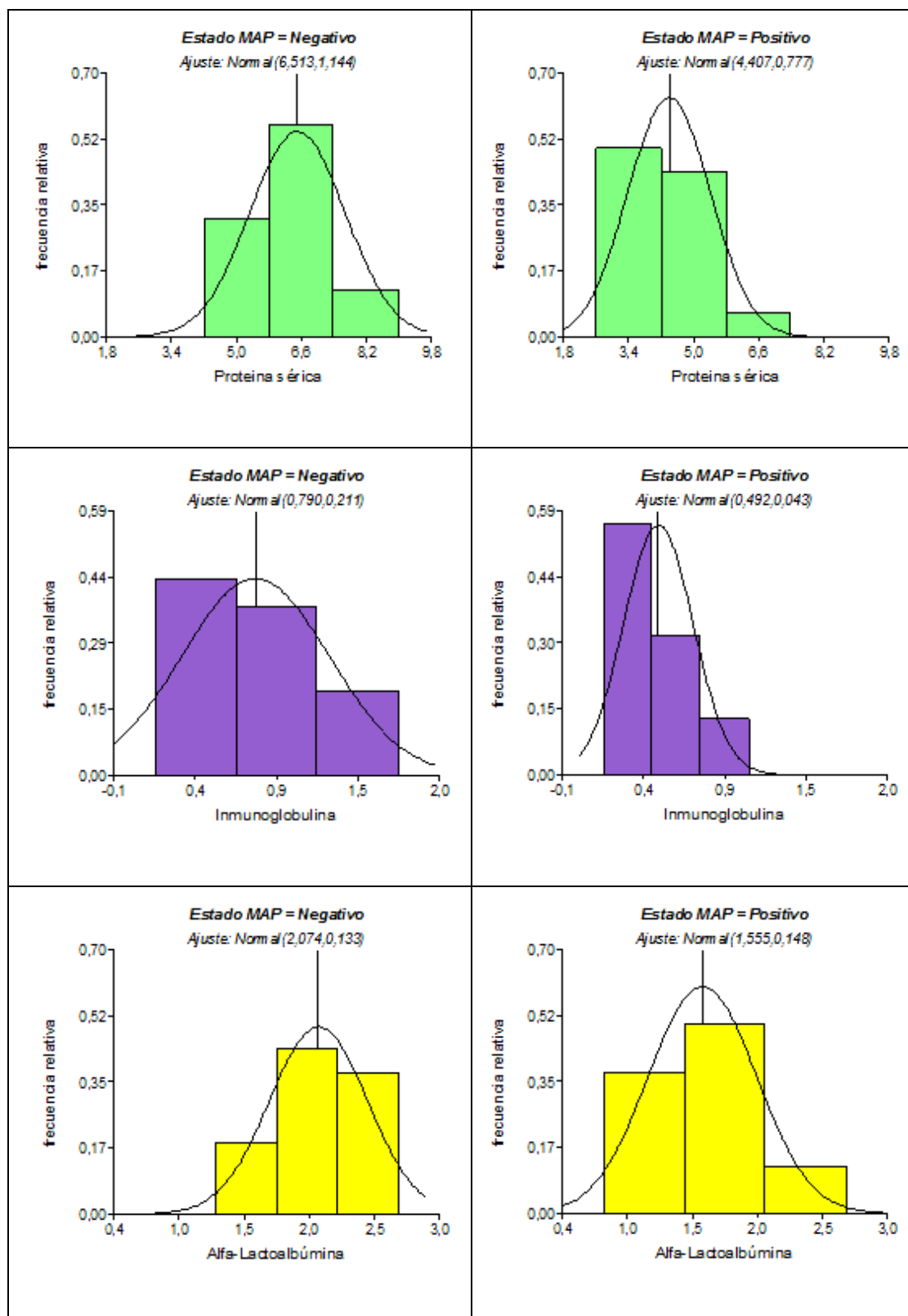
8.3.- Anexo III

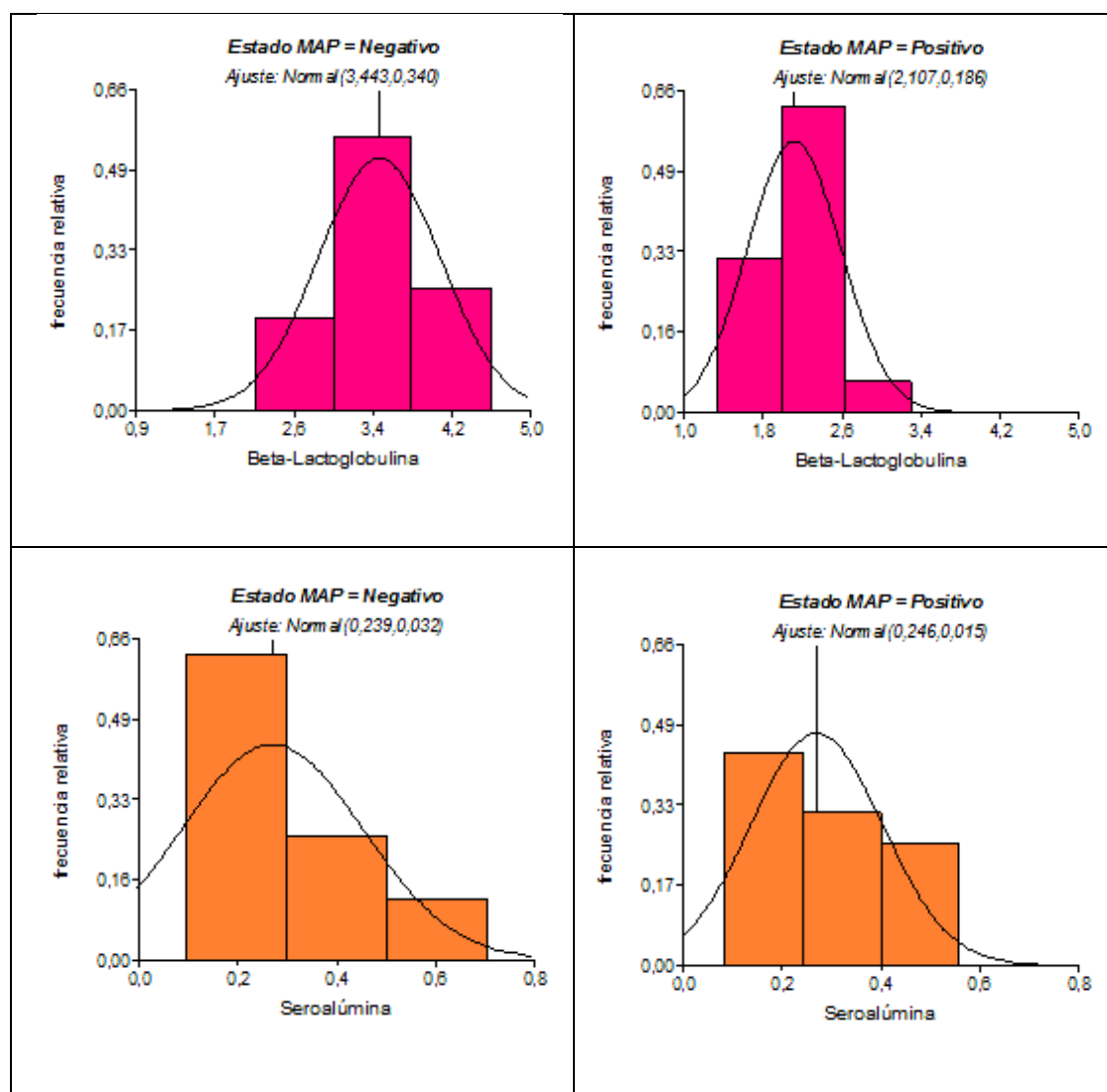
Cuadro 8.3.1. Medición individual de Proteína sérica (PS), Inmunoglobulinas (Igs), α -Lactoalbúmina (α -LA), β -Lactoglobulina (β -LG) y Seroalbúmina (SA) en el suero de leche expresados en gramo por litro (g l^{-1}) de los animales escogidos de establecimientos libres e infectados de MAP por la prueba ELISA-PPA (Positivos, Negativos) en suero de leche. Ubicación de estos animales en los grupos formados para número de Lactación (G1=1 lactancia, G2=2 lactancias, G3=3 lactancias a más) y por el tercio de lactación (T=1=1 tercio, T=2=2 tercio, T=3=3 tercio)

Número	Estado MAP	PS	Igs	α -LA	β -LG	SA	N	T
1	Positivo	3,40	0,13	1,29	1,76	0,22	3	1
2	Positivo	5,00	0,89	1,71	2,02	0,39	2	3
3	Positivo	5,20	0,71	1,92	2,44	0,12	1	1

4	Positivo	3,80	0,41	1,50	1,63	0,25	3	2
5	Positivo	5,40	0,68	2,19	2,30	0,22	3	3
6	Positivo	5,20	0,45	1,35	2,94	0,46	3	2
7	Positivo	6,00	0,80	2,27	2,56	0,33	3	2
8	Positivo	4,20	0,37	1,74	1,98	0,11	3	2
9	Positivo	4,20	0,44	1,68	1,74	0,34	3	2
10	Positivo	4,50	0,28	1,45	2,58	0,18	3	2
11	Positivo	5,00	0,58	1,80	2,20	0,42	1	2
12	Positivo	4,60	0,58	1,23	2,41	0,38	3	1
13	Negativo	5,50	0,98	1,80	2,64	0,07	3	1
14	Negativo	6,60	0,77	1,98	3,76	0,06	2	2
15	Negativo	6,00	0,83	1,79	3,70	0,28	3	2
16	Negativo	7,40	1,73	2,39	3,19	0,09	3	2
17	Negativo	7,00	1,29	2,29	3,29	0,13	1	2
18	Negativo	7,20	0,88	2,37	3,62	0,33	1	2
19	Negativo	6,50	0,63	1,79	3,98	0,08	1	2
20	Negativo	6,80	0,73	2,71	3,25	0,10	1	2
21	Negativo	7,20	0,40	1,71	4,61	0,49	1	3
22	Negativo	6,50	0,44	1,67	4,06	0,34	3	2
23	Negativo	9,00	1,73	2,68	3,89	0,69	1	1
24	Negativo	7,50	0,80	2,54	3,73	0,43	3	2
25	Positivo	4,20	0,52	1,45	2,12	0,11	3	1
26	Positivo	3,80	0,22	1,30	2,15	0,11	2	3
27	Positivo	3,40	0,42	1,24	1,57	0,16	1	3
28	Positivo	2,61	0,39	0,76	1,32	0,14	1	3
29	Negativo	5,60	0,27	2,05	3,16	0,12	3	2
30	Negativo	5,40	0,24	1,88	3,09	0,19	2	1
31	Negativo	5,00	0,45	1,72	2,68	0,16	3	2
32	Negativo	5,00	0,47	1,82	2,43	0,27	1	1

Cuadro 8.3.2. Histogramas para la frecuencia relativa de las clases de las proteínas séricas lácteas, Inmunoglobulinas, α -Lactoalbúmina, β -Lactoglobulina y Seroalbúmina expresadas en gramos por litro (g l^{-1}) comparadas por la presencia de anticuerpos MAP por la prueba ELISA-PPA (Positivos, Negativos) en suero de leche.





Cuadro 8.3.3. Estadística descriptiva considerando la media, desviación estándar, coeficiente de variación (%), cuantil 1 y 3 de la proteína sérica, Inmunoglobulinas, α -Lactoalbúmina, β -Lactoglobulina y Seroalbúmina expresados en gramo por litro (g l⁻¹) comparadas por la presencia o ausencia de anticuerpos MAP por la prueba ELISA-PPA (Positivos, Negativos) en suero de leche

	Proteína Sérica		Inmunoglobulinas		α -Lactoalbúmina		β -Lactoglobulina		Seroalbúmina	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Media	4,41	6,51	0,49	0,79	1,56	2,07	2,11	3,44	0,25	0,24
Desviación. Estándar	0,88	1,07	0,21	0,46	0,38	0,36	0,43	0,58	0,12	0,18
Coeficiente de Variación	20,00%	16,42%	42,13%	58,08%	24,74%	17,57%	20,45%	16,93%	49,89%	75,20%
Q1	3,80	5,50	0,37	0,44	1,29	1,79	1,74	3,09	0,12	0,09
Q3	5,00	7,20	0,58	0,88	1,74	2,37	2,41	3,76	0,34	0,33

Cuadro 8.3.4.- Comparación entre las concentraciones de las proteínas séricas presentes en la leche (g l^{-1}) de bovinos respecto a: estado de MAP analizado por la prueba ELISA-PPA (Positivos, Negativos) en suero de leche; tercio de lactación (T1=1 tercio, T2=2 tercio, T3=3 tercio) y al número de Lactación (G1 = 1 lactancia, G2=2 lactancias, G3=3 lactancias a más)

	MAP		Tercio de Lactación			Número de lactación			EEM ¹	Signif. ²
	+	-	T1	T2	T3	G1	G2	G3		
PS	4,4 ^a	6,4 ^b	5,5 ^a	5,9 ^a	4,7 ^a	5,6 ^a	5,6 ^a	5,1 ^a	0,25	M
IGS	0,5 ^a	0,8 ^b	0,7 ^a	0,7 ^a	0,5 ^a	0,7 ^a	0,6 ^a	0,6 ^a	0,07	M
α-LA	1,6 ^a	2,1 ^b	1,8 ^a	2,0 ^a	1,5 ^a	1,8 ^a	1,8 ^a	1,7 ^a	0,08	M
β-LG	2,1 ^a	3,4 ^b	2,7 ^a	3,0 ^a	2,4 ^a	2,8 ^a	2,8 ^a	2,6 ^a	0,15	M
SA	0,3 ^a	0,2 ^a	0,3 ^a	0,2 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a	0,03	----

¹ Error estándar de la media

² Significancia, solo se indican los factores significativos ($\alpha \leq 0,05$). M, MAP; T, tercio; N, número de lactancia.

Salida InfoStat para la Proteína sérica:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Proteína sérica.	32	0,58	0,50	18,72

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	37,13	5	7,43	7,11	0,0003
Estado MAP	35,47	1	35,47	33,96	<0,0001
Ter. lactación	0,86	2	0,43	0,41	0,6653
Numero Lac	0,79	2	0,40	0,38	0,6876
Error	27,15	26	1,04		
Total	64,28	31			

Salida InfoStat para la Inmunoglobulinas:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	Aj	CV
Inmunoglobulinas	32	0,19	0,03	58,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,84	5	0,17	1,18	0,3450
Estado MAP	0,71	1	0,71	5,03	0,0337
Ter. lactación	0,02	2	0,01	0,06	0,9380
Numero Lac	0,11	2	0,05	0,38	0,6897
Error	3,68	26	0,14		
Total	4,51	31			

Salida InfoStat para α -Lactoalbúmina:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ALA	32	0,40	0,29	21,10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,56	5	0,51	3,49	0,0152
Estado MAP	2,16	1	2,16	14,72	0,0007
Ter. lactación	0,31	2	0,15	1,06	0,3624
Numero Lac	0,09	2	0,05	0,31	0,7375
Error	3,81	26	0,15		
Total	6,37	31			

Salida InfoStat para β -Lactoglobulina:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
BLG	32	0,66	0,60	19,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	14,64	5	2,93	10,16	<0,0001
Estado MAP	14,26	1	14,26	49,45	<0,0001
Ter. lactación	0,37	2	0,18	0,64	0,5351
Numero Lac	0,01	2	0,01	0,03	0,9751
Error	7,50	26	0,29		
Total	22,14	31			

Salida InfoStat para Seroalbúmina:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Sero	32	0,03	0,00	67,03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	5	4,8E-03	0,18	0,9668
Estado MAP	3,8E-04	1	3,8E-04	0,01	0,9058
Ter. lactacion	3,0E-03	2	1,5E-03	0,06	0,9446
Numero Lac	0,02	2	0,01	0,39	0,6800
Error	0,69	26	0,03		
Total	0,71	31			

8.4.- Anexo IV

Cuadro 8.4.1. Datos económicos de los rodeos en estudio

Número de vacas	182
Número de Vacas Negativas	166
Leche diaria promedio (litros)	22,03
Producción anual esperada por vaca (l)	6934,1628
Producción anual esperada por el rodeo (l)	1262017,63
Precio promedio de la leche (ARS)	2,5
Ganancia Anual esperada del rodeo(\$)	3155044,074
Número de Vacas Positivas	16
Leche diaria promedio litros Positivas (l)	17,67
Días de producción aproximado (d)	305
Factor de corrección de Litros a Kilos. (kg)	1,032
Producción anual de kilos de leche vaca Negativa (kg/vaca)	6934,1628
Producción anual de vacas Negativas rodeo (kg)	1151071,025
Producción anual de kilos de leche vaca Positiva (kg/vaca)	5561,8092
Producción anual de vacas Positivas rodeo (kg)	88988,9472
Producción Total del rodeo muestreado (Kg)	1240059,972
Ganancia del rodeo infectado (\$)	3100149,93
Diferencia de producción total Kilos anuales (\$)	21957,6576
Pérdida Económica anual Pesos (\$)	54894,144

